



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**FUNCIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN WNT EN LA
PROLIFERACIÓN, DIFERENCIACIÓN Y TRANSFORMACIÓN
CELULAR TIROIDEA**

TESIS DOCTORAL

ANA MARÍA SASTRE PERONA

MADRID, 2013

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



**FUNCIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN WNT EN LA
PROLIFERACIÓN, DIFERENCIACIÓN Y TRANSFORMACIÓN
CELULAR TIROIDEA**

Memoria que presenta la licenciada en Bioquímica, Ana María Sastre Perona, para
optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Directora de tesis: Pilar Santisteban Sanz

Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols"

MADRID, 2013

Pilar Santisteban Sanz, Profesora de Investigación del CSIC en el instituto de Investigaciones Biomedicas "Alberto Sols", Madrid

AUTORIZA: la presentación de la tesis doctoral titulada "Función de la vía de señalización Wnt en la proliferación, diferenciación y transformación celular tiroidea" realizada bajo mi dirección, por la Licenciada en Bioquímica Ana Sastre Perona.

En esta memoria de tesis doctoral se ha estudiado el papel de la vía Wnt/ β catenina en la proliferación celular tiroidea demostrándose, por primera vez, que esta vía se activa en respuesta a TSH e IGF1, los dos principales reguladores de la función tiroidea. Además la β catenina participa en el mecanismo de diferenciación ya que activa al factor de transcripción específico de tiroides Pax8 que es el responsable del fenotipo tiroideo diferenciado. Finalmente, se ha descrito que en las células tumorales tiroideas la vía Wnt canónica juega un importante papel regulando su crecimiento e induciendo transición epitelio mesénquima y por tanto regulando la capacidad invasiva de dichas células.

El trabajo realizado por la doctoranda ha sido de gran calidad demostrando su responsabilidad científica, su enorme dedicación al trabajo y su inquietud por la búsqueda de nuevos conocimientos. Ha demostrado por tanto que tiene la formación investigadora necesaria para que este trabajo sea presentado como Tesis Doctoral en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid

Y para que conste a efectos oportunos se expide el presente certificado en
Madrid a 4 de enero de 2013

*“La ciencia se compone de errores, que a su vez,
son los pasos hacia la verdad”*

Julio Verne

“If you never try you'll never know”

**A mis padres
A mi mama Lola**

AGRADECIMIENTOS

Bueno y llega el momento de los agradecimientos, no se ni por donde empezar, hace ya casi 7 años que empezó esta carrera y han sido muchas las personas que me han ayudado a sobrevivir a esto llamado “LA TESIS DOCTORAL” (suena serio, eh??).

En primer lugar le quería agradecer a Pilar el haberme aceptado en el laboratorio (después de toda la guerra que ya había dado, no se en que estabas pensando...). Gracias por tu apoyo durante todos estos años, por tu asesoramiento y dirección científica, por tu confianza y por todas las oportunidades que me has dado y que me han hecho esforzarme para ir mejorando como científica y como persona. Y sobre todo por ese carácter desenfadado y alocado que te hacen ser una jefa tan cercana. Gracias por hacer del laboratorio una segunda casa, todos los cumpleaños que habremos celebrado y los vinitos que nos habremos tomado... A Edu, cómplice de todas estas celebraciones. Muchas gracias por tu cercanía, por tu fortaleza y tus ganas de luchar! por tener siempre una sonrisa y buen chiste que contar, por ser un grandísimo cocinero y lo más importante por enseñarme a beber gin tonic!

Y claro, que toda esta tesis no habría sido posible sin toda y cada una de las personas que han pasado por el 2.9. Marga, tengo que empezar por ti...muchas gracias por la confianza y cariño que me has dado todos estos años. Por ser una buena persona, de las mejores que conozco, nunca te vi una mala cara! aun cuando te gruñía por que no me podías hablar...jajaja anda que no te echo de menos! A Suzanita! mi compi de locura y de quejidos jijiji gracias por estar ahí estos años. Por compartir tantos buenos momentos de locura y risa, y la pasión por el café con chocolate y las croquetas! y gracias por ser una amiga de verdad. Sabes que al final todo sale bien, no? tu hazme caso :) . A Gracilaso, el señor doctor! Muchas gracias por toda tu ayuda y por compartir tu entusiasmo científico. Esas charlas y divagaciones me han hecho aprender un montón! Gracias por todos los consejos y sobre todo por tu amistad. A Aristíííides, ains que bailes nos vamos a marcar en el salón de actos! (podemos empezar el día de la tesis) te vas a reír, pero gracias por pegar gritos en el labo! jajaja así no parezco la única loca! esas sobremesas no las cambio por nada! A León, mira que llevas poquito por el labo pero hemos pasado muy buenos ratos, no cambies nunca esa curiosidad y espontaneidad que te caracterizan! A las chicas del lado oscuro (con todo el cariño del mundo ya lo sabéis!!!). Lara, Sole ya no estáis por el labo, pero he pasado muy buenos momentos con vosotras. Petriiii ves como al final se acaba??? ya no te queda nada! gracias por tu ayuda y amistad y sobre todo por esas charlas de última hora de la tarde que tanto me gustan.

A los que ya no estáis en el labo... Pablito y Ana muchas gracias por vuestra amistad, por estar siempre ahí, por las largas charlas y los cafecitos. Anita...gracias por compartir tanto conmigo, pasito a pasito llegaremos hasta donde nos propongamos. Muchas gracias a Christian por enseñarme cuando llegue al laboratorio, por tu paciencia y tu meticulosidad, no se me ha contaminado una PCR nunca! A Miguelañez, muchísimas gracias por tu ayuda y consejo durante estos años, por ayudarme a entender todo eso de la “señalización”, la importancia del 4H y por ser el señor del VLB (ahora señor de las moscas). Pero sobre todo por enseñarme a que hay que dejar de hacer experimentos y pensar!!! aunque sea súper aburrido...por que tienes razón siempre? Don Antonio de la vieja! gracias por

enseñarme a no quemar los WB! jijiji que nooo la verdad que ya no estas por el labo, pero es como si no te hubieras ido, por que siempre he contado con tu consejo y amistad, así que gracias por seguir ahí y por tu increíble positivismo! y no te olvides de una cosa, no somos nadie Antonio... A Zergio y Cristina muchas gracias por todos los buenos momentos que hemos pasado en el labo y por vuestra alegría, que es contagiosa! Si me esperáis un poquito igual nos da tiempo a pasar unos meses por NYC! María Estevez! la siguiente eres tu :) gracias porque sigo contando contigo, aunque estés allí lejos! después de la tesis ya si que si voy a verte. Magalí! Mira que pasaste poco tiempo por el labo, pero te echamos de menos y tienes que volver! (tenemos kikos y vino).

Durante los 6 años que he estado en el IIB, he conocido a muchas personas con las que con las que he compartido muy buenos momentos. A las chicas del 2.10, Pilar y Barbara y a las que ya no están, M^a Carmen, gracias a todas por vuestra ayuda y amistad. Ana Chocarro! mi compañera de Wnt! Muchas gracias por tu ayuda y por todos los trapicheos jijiji. A Carmen, Ainhona y a Jesús, gracias y a ver si os veo por los States! A mis compañer@s de cultivos por todas las horas que nos pasamos ahí metidos...o congelados y sudando como pollos! gracias a María Galardi, a Laura, a Merche y a Toño del 0.3 (que buenos papas vais a ser!), a Andrea y a las chicas del 2.4.2. A Blanca, con la que he compartido campana y biblioteca...menos mal que estabas ahí para pasar todo esto juntas...este es nuestro año! A Laura (2.5.1) gracias por las charlas de pasillo :) . A las chic@s del 1.11 que tantísimas veces me habéis ayudado...Vero, Jaime, Vanesa, Laura, María y en especial a ti Cris, que me has salvado de más de una y de dos y de tres... A las personas de los servicios, sin las que no habría podido terminar esta tesis...Guti, Antonio, Geni e Irene, y en especial a Javi, por hacer esas figuras tan bonitas. A Carlos y a Diego, por todos los buenos días y buenas noches! que sepáis que ahora que voy a ser doctora paso de llevar la tarjeta...jajaja Y como no a mi confocalera favorita! gracias Ana por esas sesiones de fotos! oy oy oy oy que bonitas nos quedan siempre!

Y por supuesto no puedo pasar por alto mis dos viajecitos a New York en los que he conocido a gente maravillosa. Sobre todo a mis dos compañeras de piso, Guarnier y Ane que se han convertido en verdaderas amigas. Para mi fue una experiencia inolvidable y no habría sido lo mismo sin vosotras! Gracias también a mis compañeros de laboratorio de la Rockefeller University, Wen-Hui, Alicia, Brice, June, Nicole, Ellen y Maria, muchas gracias por introducirme en el mundo de los pelos y por todos los buenos ratos que pasamos allí. Muchas gracias también a mis compañeros de carrera. Los biólogos, Bea, Edu, Jose Leti y Lucia, que nos cuesta pero nos seguimos viendo. A mis Power A de bioquímica! Ana Gómez, Anius y Vero, que buenos momentos hemos pasado con nuestro amigo Peter y los súper Villanos :) . Y a los que habéis pasado por el IIB que ya sois doctor@s o estáis apuntito, Irene, Cris, Patri Rada, Jorge...Ha sido un placer!

Y si el apoyo en el laboratorio ha sido importante, el de fuera ya ni os cuento! Muchas gracias a mis murcianicos Rocio, Pati, Txumari, Miguel, Francho y Lasso por todos esos veranos inolvidables. A Carlos, al final ya has aceptado que me tienes que ver por Madrid, eh??? y a sus amigos, a los que me he acoplado porque yo no tengo claro,Vila, Vic, Arjona...gracias por todos los viajes de esquí y fiestas varias. A Pable mi compi de viaje y profesor de música jajaja tenemos pendiente NYC otra vez!! A Robert, por aguantarme de ocupa en su casa y por toda tu ayuda con la tesis...que bonika va a quedar!

A Aitor, por ser tan buen compañero de fiesta, no digo más! A Marta y a Carlos, que no paren esas cenitas!! a mi Miriam! que no se rinde conmigo nunca :) Lauri! me alegro de haber compartido tantos fines caseros contigo, así somos dos contra Miguel! jejeje. Gracias a Rachel, tu vitalidad y ganas de hacer cosas son contagiosas!

Y dejo casi para el final a mis niñas, porque lo bueno se hace esperar...madre mía, parece mentira que vaya a leer la tesis! aun no me lo creo...ya sabéis que no soy muy buena con estas cosas...pero allá voy! Patri, mil gracias por estar ahí, desde que descubrimos a Peter anda que no ha llovido...y aquí seguimos las dos. Lorelai, que siempre tienes tiempo para mandarme un mensajito, muchas gracias por escucharme siempre! no todo el mundo entiende de agobios...jejeje. A Sara mi murcianika, al final hice bien dejándote entrar a mi casa aquel día jeje. Que sepas que eres un ejemplo de superación personal y me alegro de tenerte a mi lado. Mechis cojones! gracias por se mi energía positiva, no te imaginas todo lo que me has ayudado...tienes una fuerza y energía que ya quisiera yo! no cambies nunca. A la turríta, ay Leti! que esto se acaba! que mierdorrrr! gracias por estar ahí día a día apoyándome, por entender todas mis frikadas (porque tu eres mucho peor claro! :D), no sabes todo lo que me has ayudado de verdad... Encontraremos nuestro sitio ya verás! y sino siempre nos queda el lado oscuro...que nos gusta mucho más. Y por último Repecunin...que te voy a decir que no sepas ya...gracias por acercarte aquel día en el Tagore a preguntarme si quería jugar contigo...han sido muchos años de amistad (22 ya!), de apoyo, de viajes, de miles de fiestas y experiencias (la de aprender a componer canciones la mejor de todas), sabes que un cachito de esta tesis también es tuya.

Muchas gracias a toda la familia por su constante apoyo, a mis dos abuelos, a mis tíos y primos. Y especialmente gracias a mi abuela (mi mama Lola), por que me enseñó mucho sobre la vida y por que se que le habría encantado estar aquí, te echo de menos.

Y por último y por que sois los más importantes gracias a mi hermano y a mis padres. Nano, lo nuestro es pelearnos, que le vamos a hacer...pero que sepas que ver la constancia y dedicación que le pones a la medicina día a día me ha ayudado mucho durante toda la tesis, así que gracias! Algún día serás un buen médico y espero que doctor también! A mis padres, gracias por ser un ejemplo a seguir. Por todo el apoyo que me habéis dado durante todos estos años...pero sobre todo por vuestra paciencia, que hay que tener una poca para aguantar mis quejidos...jejeje por todo lo que me habéis enseñado de la vida y de la ciencia, espero haber heredado algo...dicen que la ciencia va en los genes. Siempre he pesando que sois unos súper padres pero además os superáis día a día. Algo tenéis que haber hecho bien, por que al final parece que voy a leer la tesis y todo. Os la dedico por que también es vuestra.

MUCHISIMAS GRACIAS A TODOS!!!

Y que la fuerza os acompañe...

RESUMEN

El tiroides es el encargado de la producción de las hormonas tiroideas. Las células tiroideas diferenciadas expresan los factores de transcripción Nkx2-1, FoxE1 y Pax8 que son los responsables de la expresión de los genes específicos tiroideos como es el simportador de sodio/iodo (NIS). Los tirocitos son células de crecimiento lento, pero precisan de la hormona tirotrópica (TSH) y del IGF1 para su correcta proliferación. Se ha relacionado a la vía Wnt/ β catenina (β cat) con el crecimiento de los tirocitos, debido a que la inhibición de GSK3 β lleva a un aumento de su proliferación. Además se ha relacionado la activación de la vía Wnt con estadios tardíos de la progresión del cáncer de tiroides. Por este motivo decidimos analizar el estado de dicha vía en respuesta a TSH e IGF1, así como su activación en células tumorales tiroideas. Hemos demostrado que tanto TSH como IGF1 inducen un aumento de los niveles de β cat nuclear, distintivo de la activación de la vía Wnt, aumentando su actividad transcripcional. Este efecto fue inducido de dos formas, (i) inhibiendo la actividad de GSK3 β y (ii) fosforilando la β cat en las S552 y 675. La acumulación nuclear de β cat, inducida por TSH e IGF1, resultó en un aumento de la proliferación celular, ya que la inhibición de la actividad de β cat redujo marcadamente la expresión de ciclinaD1 y la síntesis de DNA en respuesta a estos factores de crecimiento. Además, β cat está involucrada en la diferenciación celular tiroidea ya que demostramos que regula la expresión de Pax8 en respuesta a TSH. Aún más, β cat interacciona físicamente con Pax8, aumentando su actividad transcripcional sobre el promotor de NIS. Se ha descrito la activación aberrante de la vía Wnt/ β cat como un evento tardío en el proceso de transformación tiroidea, afectando a los tumores tiroideos más desdiferenciados. Sin embargo, recientes publicaciones han demostrado la implicación de esta vía en estadios más tempranos de la carcinogénesis tiroidea. En este trabajo estudiamos la activación de la vía Wnt en células tumorales en respuesta a mutaciones en RAS (H/N/K), BRAF y deleciones en PTEN, alteraciones genéticas involucradas en la iniciación del cáncer de tiroides. La expresión del oncogén HRAS en células tiroideas, pero no la de BRAF, indujo la inhibición de GSK3 β y la acumulación de β cat en el núcleo, aumentando la actividad transcripcional dependiente de β cat a través de su fosforilación en la S552. Además observamos un efecto similar en varias células tumorales tiroideas humanas que contenían mutaciones en RAS y deleciones en PTEN. De acuerdo con los datos obtenidos con el oncogén HRAS, la regulación de estos procesos fue dependiente de la actividad de PI3K/Akt, pero no de las MAPK, indicando un papel diferencial de estas vías en la regulación de β cat. El silenciamiento de la expresión de β cat en estas células indujo una reducción drástica de la proliferación celular, que fue debida a la inducción de senescencia y que se correlacionó con una disminución del crecimiento tumoral en ratones inmunodeprimidos. La inhibición de la expresión de β cat además, indujo una transición mesénquima-epitelio, disminuyendo la capacidad invasiva de las células tumorales. En conjunto esta tesis demuestra que TSH e IGF1 controlan la actividad de β cat a distintos niveles resultando en la proliferación y diferenciación de las células tiroideas. Además, describimos un mecanismo innovador de estabilización de β cat en células tumorales tiroideas, dependiente de la actividad de Akt, pero no de MAPK, confirmando que β cat tiene un papel funcional en las células de cáncer de tiroides, controlando la proliferación celular y la transición epitelio-mesénquima.

SUMMARY

The thyroid is responsible for thyroid hormones production. Differentiated thyroid cells express the transcription factors NKx2-1, FoxE1 and Pax8 that are responsible for thyroid specific gene expression such as the sodium iodide symporter (NIS). The thyrocytes are low proliferating cells that required thyrotropin (TSH) and IGF1 for them to proliferate. The Wnt/ β catenin (β cat) pathway has been related with thyroid cell growth, since the inhibition of GSK3 β leads to increased cell proliferation. Also the activation of the Wnt pathway has been involved in late stages of thyroid cancer progression. For these reason in this work we decided to analyze the status of this pathway in response to TSH and IGF1 as well as to characterize its activation in thyroid tumoral cells. We have shown that both TSH and IGF1 lead to an increase in β cat nuclear levels, a hallmark of the Wnt/ β cat pathway activation, increasing its transcriptional activity. This effect was induced in two ways, (i) inhibiting GSK3 β activity and (ii) phosphorylating β cat at S552 and 675. The high accumulation of nuclear β cat induced by TSH and IGF1 mediates cell proliferation, because when the β cat activation was abolished, levels of cyclinD1 and DNA synthesis, in response to the two growth factors, were dramatically reduced. In addition, β cat is involved in thyroid cell differentiation as we found that it mediates Pax8 expression in response to TSH. Even more, β cat interacts physically with Pax8 increasing its transcriptional activity over NIS promoter. Aberrant activation of the Wnt/ β cat pathway has been described as a late event in the thyroid cell transformation affecting to the most undifferentiated thyroid tumors. Nevertheless, increasing evidence has shown the involvement of this pathway in the earliest stages of thyroid tumor progression. Here we study the activation of the Wnt pathway in tumor cells carrying RAS (H/N/K) and BRAF mutations and PTEN deletions, genetic events that are known to be involved in thyroid cancer initiation. Expression of HRAS, but not BRAF in thyroid cells, induced GSK3 β inhibition and β cat nuclear accumulation increasing the β cat-dependent transcriptional activity through its phosphorylation at S552. We also found similar results in several human thyroid tumor cells carrying RAS mutations and PTEN deletion. In agreement with the data obtained with HRAS mutation, the regulation of these processes was dependent on PI3K/Akt activity, but not on MAPK, indicating a differential role of these signaling pathways in β cat regulation. Knock-down of β cat expression in these cells leads to a dramatic reduction in cell proliferation, that is due to an induction of senescence, and which correlates with a reduction in tumor formation in nude mice. Silencing of β cat also induces mesenchymal-epithelial transition, decreasing the invasive capacity of the tumor cells. Altogether this thesis demonstrates that TSH and IGF1 control β cat activity at different levels resulting in thyroid cell proliferation and differentiation. Furthermore, it describes a novel mechanism of β cat stabilization in thyroid tumor cells, dependent on Akt activity but not on MAPK, confirming that β cat has a functional role in thyroid cancer cells, controlling cell proliferation and epithelial- mesenchymal transition.

INDICE

ABREVIATURAS.....	1
INTRODUCCIÓN	1
1.- La Glándula tiroidea	7
1.1.- Síntesis y secreción de las Hormonas tiroideas.....	7
1.2.- Desarrollo del tiroides.....	9
2.- Señales extracelulares implicadas en el control de la célula tiroidea.....	9
2.1.- La tirotropina (TSH)	9
2.2.- Otras vías de señalización activadas por TSH	11
2.3.- El factor de crecimiento IGF1	12
3.- Regulación de la proliferación por TSH e IGF1	13
4.- Regulación de la diferenciación por TSH e IGF1	15
5.- Cáncer de tiroides.....	17
5.1.- Clasificación.....	17
5.2.- Alteraciones genéticas en cáncer de tiroides.....	18
5.3.- Progresión tumoral	20
5.3.1.- Senescencia inducida por oncogenes	20
5.3.2.- Metástasis y transición epitelio mesénquima	20
6.- Vías Wnt	21
6.1.- Vía Wnt/ β catenina.....	22
6.2.- Vías no canónicas.....	23
6.3.- Inhibidores de Wnt	24
6.4.- β catenina	24
7.- Vía Wnt/βcatenina en tiroides y cáncer de tiroides.....	25
OBJETIVOS	27
Materiales y métodos.....	29
1.- Materiales	29
1.1.- Anticuerpos.....	29
1.2.- Plásmidos	30
1.3.- Oligonucleótidos.....	32
1.4.- Líneas celulares.....	33
1.5.- Ratones.....	33
2.- Métodos	34

2.1- Cultivos celulares.....	34
2.2- Obtención de cultivos primarios de tiroides de ratón.....	35
2.3- Métodos de detección de RNA	35
2.3.1- Extracción de RNA	35
2.3.2- RT-PCR	35
2.3.3 PCR cuantitativa (Q-PCR).....	36
2.4- Métodos de detección de proteínas	36
2.4.1- Extracción de proteínas totales, nucleares y citoplasmáticas	36
2.4.2- Western-blot e inmunodetección	36
2.4.3- Inmunoprecipitación	37
2.4.3- Inmunofluorescencia e inmunohistoquímica de células y tejidos.....	37
2.5- Generación de líneas celulares mediante el uso de lentivirus.....	38
2.6- Transfecciones transitorias	39
2.7- Ensayo de incorporación de BrdU.....	40
2.8- Medida del crecimiento celular	40
2.9- Ensayo de detección de senescencia	40
2.10- Generación de ratones Hipertiroides (T4/T3) e Hipotiroides (MMI)	41
2.11- Ensayos de tumorigénesis <i>in vivo</i>	41
2.12- Ensayo de invasividad en matrigel	41
Resultados	29
1- Función de la vía Wnt/βcatenina en la proliferación y la diferenciación celular tiroidea	43
1.1- Caracterización de las vías Wnt en células tiroideas diferenciadas de rata.....	43
1.2- TSH e IGF1 inducen la entrada al núcleo de β catenina y la inhibición de GSK3 β	44
1.3- TSH e IGF1 inducen un aumento de la actividad transcripcional de β catenina.....	48
1.4- La expresión de β catenina está regulada por cAMP en cultivos primarios de tirocitos	51
1.5- La expresión β catenina está regulada por TSH en el tiroides de ratón.....	52
1.6- TSH e IGF1 inducen proliferación de forma dependiente de β catenina a través de la expresión de ciclinaD1	53
1.7- β catenina regula la expresión de Pax8	56
1.7.1- Regulación del promotor de Pax8.....	57
1.8- β catenina regula la actividad de Pax8	60
2- Función de la vía Wnt/βcatenina en cáncer de tiroides	62
2.1- El expresión del oncogén HRASV12, pero no la de BRAFV600E, induce la activación de la vía Wnt/ β catenina.....	63
2.2- La vía PI3K, pero no MAPK, regula la expresión de β catenina en células tumorales tiroideas humanas a través de su fosforilación en la serina 552	65

2.3- El silenciamiento de β catenina inhibe la síntesis de DNA a través de la inducción de senescencia en células tumorales tiroideas humanas	70
2.4- El silenciamiento de la β catenina induce la expresión de la E-cadherina en células FTC133 a través de la represión de la expresión de factores de transcripción de EMT e inhibe la invasión celular	73
2.5- El silenciamiento de la β catenina reduce el crecimiento tumoral de las células FTC133	74
Discusión	43
Funciones Wnt-independientes de la βcatenina en la proliferación y diferenciación de la glándula tiroidea	77
TSH e IGF1 regulan la localización y actividad transcripcional de la β catenina	77
Implicación de la β catenina en la proliferación inducida por TSH e IGF1	81
Implicación de la β catenina en la diferenciación de las células tiroideas.....	82
β catenina actúa como activador transcripcional de Pax8	85
Papel de βcatenina en la carcinogénesis tiroidea. Conexión entre las vías PI3K/Akt y Wnt/βcatenina	86
Conclusiones.....	93
Bibliografía	77
ANEXO I: PUBLICACIONES RELACIONADAS	96

ABREVIATURAS

14-3-3 ζ : proteína de andamiaje perteneciente a la familia de las proteínas 14-3-3

A

- AC: Adenilato ciclasa
- Akt/PKB: proteína quinasa B
- APC: "Adenomatous Polyposi Coli"
- Arm: Repeticiones en armadillo

B

- BAD: Antagonista de Bcl-2/Bcl-XL, que provoca muerte celular
- Bcl-2: Proteína de células de linfoma B tipo 2
- Bcl9: co-activador transcripcional de la β catenina
- Bcl-XL: Proteína extragrande de células de linfoma B
- BMP: Proteína morfogénica ósea
- BRAF: Homólogo B1 del oncogén v-raf del virus del sarcoma murino
- BrdU: Bromodesoxiuridina, análogo de la timidina

C

- CaMKII: calmodulina quinasa II
- cAMP: AMP cíclico
- cAMP-GEF/Epac: Proteínas de intercambio de nucleótidos de guanina activadas por cAMP
- CAT: carcinoma anaplásico de tiroides
- CBP: Proteína de unión a CREB (acetil transferasa de histonas)
- CDK2: Kinasa dependiente de ciclina-2
 - CDK4: Kinasa dependiente de ciclina-4
- CFT: carcinoma folicular de tiroides
- Ciclina D1 y D3: ciclinas específicas de la fase G1/S del ciclo celular
- Ciclina E: ciclinas específicas de la fase G1/S del ciclo celular
- c-jun: factor de transcripción que junto a c-fos forma el factor de transcripción AP-1
- CK1: Caseína kinasa-1
- c-myc: protooncogén de la familia myc diana de la vía Wnt/ β catenina
- CN: calcineurina
- CPDT: carcinoma pobremente diferenciado de tiroides

- CPT: carcinoma papilar de tiroides
- CRE: Elemento de respuesta a cAMP
- CREB: Proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP
- CTNNB1: gen que codifica la proteína β catenina

D

- DKK: "*Dickkopf*", antagonista de WNT
- DUOX1/2: Oxidasa dual uno y dos
- DVL: "*Dishevelled*", proteína mediadora de la vía WNT

E

- E2F: Factor de Elongación 2
- EGF: Factor de crecimiento epidérmico
- EMT: transición epitelio-mesénquima
- ERK: Kinasa regulada extracelularmente

F

- FoxE1: factor de transcripción "Forkhead box E1", también conocido como TTF2 de factor de transcripción tiroideo 2
- FoxO: factor de transcripción "Forkhead box O"
- Fz: Frizzled, receptor de la vía WNT acoplado a proteínas G
- FT: factores de transcripción

G

- GPCR: Receptor acoplado a proteína G
- Grg: represor transcripcional Groucho
- GSK3 β : Glicogeno sintasa quinasa 3 β

H

- HDAC: Histona Deacetilasa
- HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos
- hHex: factor de transcripción "*homeobox*"
- HT: Hormonas Tiroideas
- HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos

I

- IGF1: Factor de crecimiento similar a insulina 1
- IGF1R: Receptor del factor de crecimiento similar a insulina 1
- IRS-1/2: Sustrato del receptor de insulina-1 y 2

J

- JNK: quinasa del extremo N-terminal de c-jun

L

- LiCl: Cloruro de Lítio
- LRP: Receptores de la familia de proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteínas (LDL)

M

- MAPK: Proteína kinasa activada por mitógenos
- Met: receptor de HGF con actividad tirosina quinasa
- MMP: metaloproteasas de matriz extracelular
- mTOR: Diana de rapamicina de mamíferos

N

- NIS: Simportador de Na^+/I^-
- Nkx2-1: factor de transcripción "homeobox" también conocido como TITF1 de factor de transcripción tiroideo 1
- NUE: "NIS upstream enhancer"

P

- p14^{ARF}: Proteína inhibidora de mdm2 (inhibidor de p53)
- p16^{INK4a}: Proteína inhibidora de CDK4
- p21^{CIP}: Proteína inhibidora de los complejos ciclina-CDK1/2
- p27^{KIP}: Proteína inhibidora de CDK2/4
- p53: gen supresor tumoral que se activa en respuesta al daño al DNA
- p300: Proteína de unión a E1A
- Pax8: factor de transcripción "Paired box8"
- PCP: polaridad planar celular
- PDK1: quinasa dependiente de 3'-fosfoinosítidos-1
- PH: Dominio homólogo de pleckstrina
- PI3K: Fosfatidil-inositol 3'-quinasa

- PI3KCA: subunidad catalítica de la PI3K
- PIP2: Fosfatidil-inositol 4,5-bisfosfato
- PIP3/PtdIns(3)P: Fosfatidil-inositol 3,4,5-trifosfato
- PKA: Proteína quinasa dependiente de cAMP
- PKB/Akt: Proteína quinasa B
- PKC: Proteína quinasa C
- PLC β : Fosfolipasa C β
- PLC γ 2: Fosfolipasa C γ 2
- PLD: Fosfolipasa D
- PP1: Proteína fosfatasa-1
- PP2A: Proteína fosfatasa-2A
- PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
- PtdIns: Fosfatidil-inositol
- PTEN: Fosfatasa y homólogo de tensina deletado en el cromosoma 10

R

- Raf-1: Homólogo 1 del oncogén v-raf del virus del sarcoma murino
- Rap1: Proteína próxima a Ras-1
- Raptor: Acompañante de mTOR sensible a rapamicina. Complejo TORC1
- Ras: GTPasa pequeña
- Rb: retinoblastoma
- Rictor: Acompañante de mTOR insensible a rapamicina. Complejo TORC2
- RhoA: Proteína homóloga de Ras-A
- Ror: receptor huérfano 2 con actividad tirosina quinasa

S

- SA- β -gal: β -galactosidasa asociada a senescencia.
- SFRP Proteínas secretadas relacionadas con Frizzled
- Shc: Proteína con dominio SH2
- Soggy: inhibidor de Wnt de la familia de DKK

T

- T3: Triyodotironina
- T4: Tiroxina
- TCF/LEF: Factor de transcripción específico de las células T/factor potenciador de linfocitos
- Tg: Tioglobulina

- TGFβ: factor de crecimiento transformante beta
- TLE: proteínas co-represoras que forman complejos con las HDAC ("*Transducin- like enhancer of split*")
- TP53: gen que codifica la proteína p53
- TPO: Tiroperoxidasa
- TSH: Hormona estimulante del tiroides, hormona tirotrópica o tirotrópica.
- TSHR: Receptor de la hormona estimulante del tiroides

W

- WIF: Factor inhibidor de Wnt
- WRE: Elemento de respuesta a Wnt.

o

INTRODUCCIÓN



1.- La Glándula tiroidea

El tiroides es una de las glándulas endocrinas más grandes. Se localiza en el cuello a la altura del cartílago cricoides y está formada por dos lóbulos que se sitúan a ambos lados de la tráquea y se unen anteriormente por un istmo (Fig 1 panel izquierdo).

Está formada principalmente por dos tipos celulares, las células parafoliculares o células C, que son las responsables de la secreción de calcitonina, y las células foliculares o tirocitos, que es la población mayoritaria del tiroides y la responsable de la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas (Helmbrecht, 2001). Ambos tipos celulares tienen un origen embrionario distinto, las células C derivan de la cresta neural, mientras que los tirocitos tienen su origen en el endodermo. Los tirocitos son células epiteliales y polarizadas que se disponen en una monocapa formando folículos y dejando en el centro un lumen denominado coloide (Fig 1 panel derecho). Por el contrario las células C se sitúan de forma aislada en los espacios inter-foliculares.

Los folículos van a conformar las unidades funcionales del tiroides, capaces de sintetizar, acumular y secretar las HT tiroxina (T_4) y triyodotironina (T_3). Las HT son potentes reguladores de la proliferación y diferenciación de muchos tipos celulares y tienen un papel importante en procesos clave como es el crecimiento, desarrollo y la homeostasis de diversos tejidos, así como en el cáncer (Pascual, 2012).

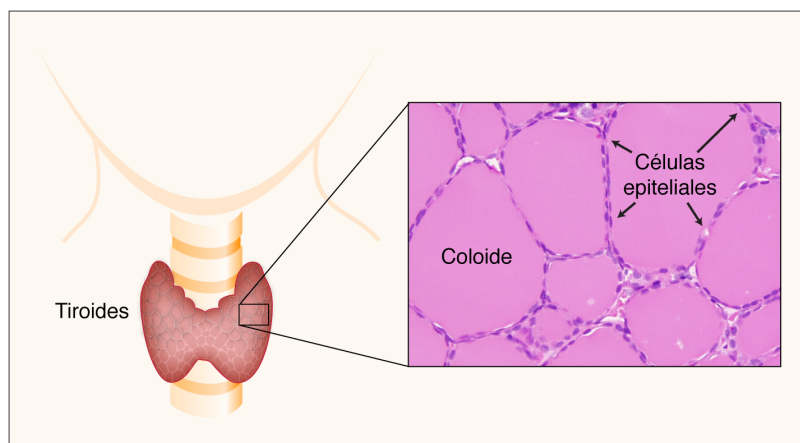


Fig.1-. Panel izquierdo: Localización y morfología de la glándula tiroidea: La glándula tiroidea está formada por dos lóbulos unidos por un istmo y se sitúa en la parte anterior de la tráquea. **Panel derecho: Arquitectura de los folículos tiroideos:** Fotografía de un corte de tejido tiroideo humano teñido con hematoxilina y eosina, observado al microscopio óptico con un objetivo de 20 aumentos.

1.1-. Síntesis y secreción de las Hormonas tiroideas

El componente principal de las HT es el yodo por lo que la célula tiroidea tiene que ser capaz de acumular grandes cantidades de este elemento. La proteína responsable de captar I^- es el simportador de Na^+/I^- (NIS) (Dai, 1996). NIS es una glicoproteína transmembrana localizada en la membrana basolateral de las células foliculares (Fig 2), la cual es capaz de transportar de forma activa I^- desde el torrente sanguíneo al interior de los tirocitos. Una vez dentro de la célula, el I^- difunde al

coloide a través de transportadores aun poco conocidos, como la pendrina (Yoshida, 2004). En el coloide el I^- se incorpora a la proteína mayoritaria del tiroides y precursora de las HT, la Tiroglobulina (Tg). En esta proteína, que se sintetiza en el interior del tirocito y se secreta al lumen del folículo, es donde se va a acumular el I^- constituyendo hasta el 80% del llamado coloide (Degroot, 1977).

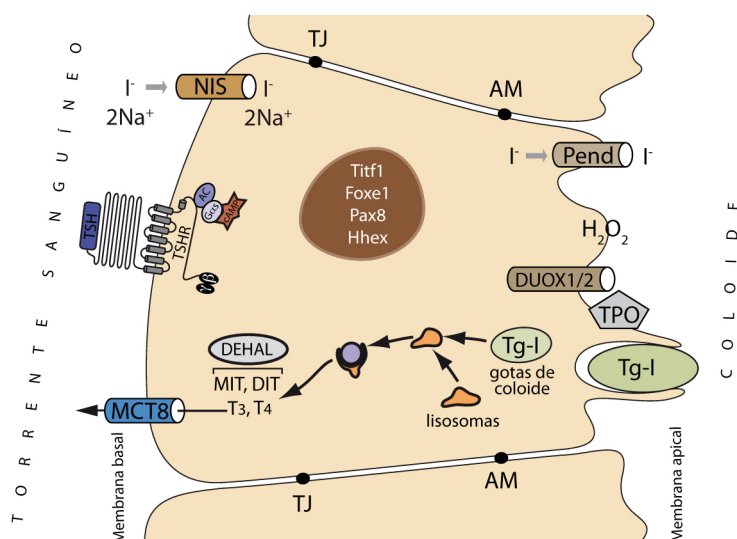


Fig.2.- Representación esquemática de la biosíntesis y secreción de las hormonas tiroideas en una célula folicular tiroidea. NIS: Simportador de Na^+/I^- , DUOX: Oxidasa dual, TPO: Tiroperoxidasa, Tg: Tiroglobulina, T₃: Triyodotironina, T₄: Tiroxina, TSH: Tirotropina, TSHR: Receptor de tirotropina.

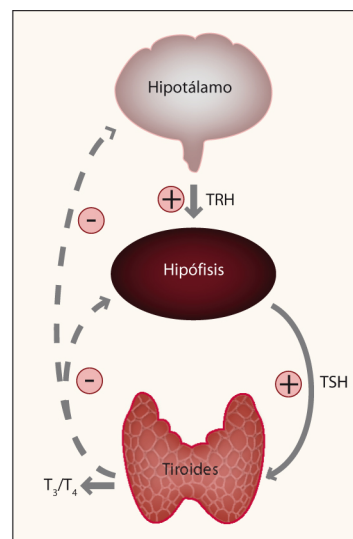


Fig.3.- Regulación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides. TRH: hormona liberadora de TSH. TSH: hormona estimulante del tiroides.

Para que se lleve a cabo el proceso de yodación de la Tg, el I^- es oxidado por el enzima Tiroperoxidasa (TPO) utilizando como sustrato el H_2O_2 producido por las oxidasas duales DUOX1/2 (De Deken, 2002). Posteriormente el I^+ es acoplado a los residuos de tirosina de la Tg, acumulándose en el coloide. La síntesis y secreción de hormonas tiroideas, va a ser regulada por la hormona hipofisiaria (TSH) también denominada hormona tirotrópica o tirotropina (Dumont, 1991). En respuesta a TSH, la Tg es endocitada desde el coloide, mediante un proceso de pinocitosis (Bernier-Valentin, 1991), e hidrolizada por enzimas lisosomales, dando lugar a las HT (T_3 y T_4) que se secretan al torrente sanguíneo.

La TSH es secretada en la hipófisis, en respuesta a la TRH (Hormona liberadora de tirotropina) secretada a su vez en el hipotálamo (May, 1973). Para asegurar que los niveles de T_3 y T_4 sean siempre los correctos, las HT, establecen un mecanismo de *feedback* negativo, inhibiendo tanto la secreción de TRH a nivel del hipotálamo, como la liberación de TSH a nivel de la hipófisis (Shenkman, 1973) (Fig 3).

Las proteínas mencionadas anteriormente (NIS, Tg y TPO) junto con el receptor de TSH (TSHR) son absolutamente necesarias para la correcta función tiroidea y su expresión conjunta solo se da en dicho tejido, por lo que se les ha denominado genes de diferenciación tiroidea. La expresión de estos genes en el individuo adulto está regulada por TSH a través de los factores de transcripción

CREB, Pax8, Nkx2-1 y FoxE1, expresándose estos tres últimos factores en su conjunto sólo en las células tiroideas (Braverman LE 2013).

1.2-. Desarrollo del tiroides

Durante el desarrollo embrionario la glándula tiroidea se origina a partir de un grupo de células derivadas del endodermo, que van a formar el esbozo tiroideo. Estas células dan lugar a los precursores tiroideos tras la inducción de la expresión de los factores de transcripción Hhex, Pax8, Nkx2-1 y FoxE1 que se expresan en ratón en el día embrionario (E8.5). Posteriormente estas células van a proliferar y a migrar hacia su localización permanente, donde finalmente sufrirán un proceso de diferenciación y formarán estructuras foliculares en un proceso conocido como foliculogénesis y que tiene lugar entre los días E14.5-E16. De esta manera adquieren el fenotipo tiroideo definitivo y la capacidad de secretar HT (Fagman, 2011).

La generación de ratones *knock out* de estos factores de transcripción ha posibilitado el conocimiento de los procesos que controlan durante la morfogénesis del tiroides y aunque aún no se conocen en detalle, se ha demostrado que son fundamentales para la correcta formación de la glándula (De Felice, 2011). Hhex y Nkx2-1 pertenecen a la familia de factores de transcripción codificados por genes con dominio de unión al DNA del tipo *homeo box*, mientras que Pax8 pertenece a la familia de genes *paired box*. La ausencia de cualquiera de estos tres factores de transcripción, causa la desaparición del esbozo tiroideo entre los días E9 y 10 y la consecuente agenesia o falta de tiroides en los ratones adultos, por lo que se ha relacionado su función con proliferación y supervivencia (Rossi, 1995; Kimura, 1996; Mansouri, 1998; Martinez Barbera, 2000). Finalmente, FoxE1 pertenece a la familia de los factores de transcripción *fork-head* y su falta de expresión, va producir dos fenotipos, agenesia tiroidea, al interferir con la formación del esbozo tiroideo, o un fenotipo de tiroides ectópico, es decir, fuera de su ubicación normal debido a un defecto en la migración de los precursores tiroideos (De Felice, 1998).

2-. Señales extracelulares implicadas en el control de la célula tiroidea

2.1-. La tirotropina (TSH)

La TSH es el principal regulador de la glándula tiroidea adulta. A través de la interacción con su receptor (TSHR) estimula diversos procesos de las células tiroideas, como son su proliferación o la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas (Dumont 1971; Dumont, 1971b). Los ratones carentes del TSHR o que no secretan TSH, presentan un desarrollo del tiroides normal hasta el momento del nacimiento, pero posteriormente la glándula aparece atrofiada y la expresión de los genes de diferenciación TPO y NIS se ve dramáticamente reducida (Postiglione, 2002).

El TSHR es un receptor de siete dominios transmembrana, acoplado a proteínas G heterotriméricas (GPCRs) que se localiza en la membrana basal de las células tiroideas (Fig 4). A concentraciones fisiológicas de TSH, va a mediar su señal mayoritariamente activando proteínas G pertenecientes a la familia *G α s* (Vassart, 1992). La liberación de la subunidad *G α s* tras la unión de TSH a su receptor, va a promover la activación de la adenilato ciclasa, que se encuentra asociada a la membrana plasmática y el correspondiente aumento en los niveles intracelulares de cAMP (Calebiro, 2009).

El cAMP es el principal mediador de la señal inducida por TSH y al contrario de lo que ocurre en otros sistemas celulares (Indolfi, 1997), su aumento está relacionado con un estímulo proliferativo (Roger, 1984; Dere, 1986). Como consecuencia, los ratones transgénicos que contienen altos niveles de cAMP en el tiroides, presentan una glándula hiperplásica y alta expresión de NIS Y TPO (Ledent, 1992).

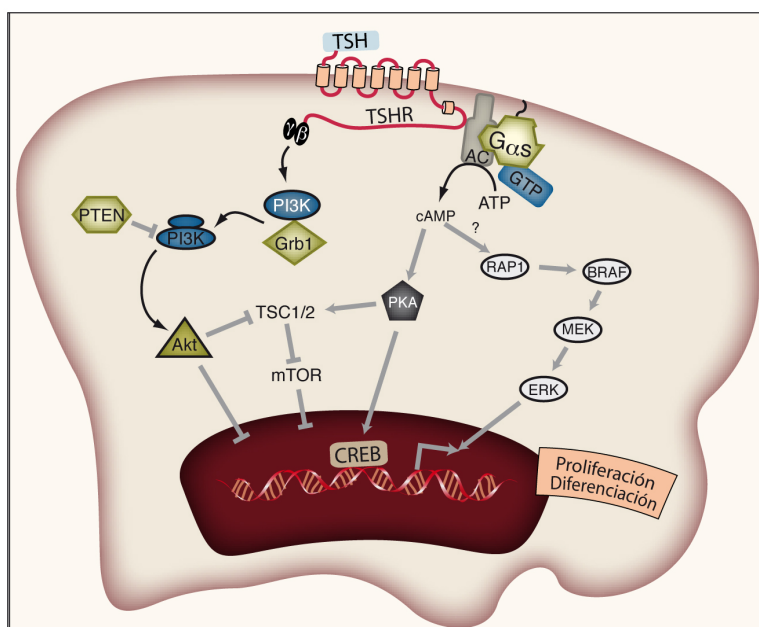


Fig.4-. Vías de señalización activadas por TSH.

Tras la activación del receptor de TSH se activa mayoritariamente la vía de la subunidad *G α s*, activando a la enzima adenilato ciclasa (AC) que promueve la generación del segundo mensajero cAMP a partir de ATP. El cAMP puede activar diversas vías de señalización, actuando sobre la PKA (Proteína quinasa dependiente de cAMP) que transmite su señal a través del factor de transcripción CREB (Proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP). La PKA también puede activar al complejo mTOR1. Así mismo el cAMP puede activar la cascada de las MAPK a través de la activación de la GTPasa RAP1. Por último la liberación de los dímeros $\beta\gamma$ activará a la quinasa PI3K y a su efector Akt. Las flechas indican activación y las líneas truncadas inhibición.

Este aumento de cAMP va a tener como diana principal la activación de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) (Kupperman, 1993; Cass, 1999). La PKA es un tetrámero formado por dos subunidades catalíticas (C) y dos reguladoras (R). En células de mamíferos existen dos tipos de PKA (PKAI y PKAII) que difieren en la subunidad reguladora, de las cuales hay dos tipos RI y RII. A su vez, encontramos dos isoformas de cada subunidad reguladora, dos RI (RI α y RI β) y dos RII (RII α y RII β), codificadas por diferentes genes (*PRKAR1A*, *PRKAR1B*, *PRKAR2A* y *PRKAR2B*). La expresión de las subunidades R es dependiente de tejido así como de su localización subcelular. Además la expresión y función de las distintas isoformas también varía dependiendo del origen animal de la célula tiroidea. En células tiroideas de rata (el sistema modelo utilizado en esta tesis), se ha caracterizado la expresión de tres de ellas, *PRKAR1A*, *PRKAR2A* y *PRKAR2B*, aunque los efectos

ejercidos por la TSH tanto en proliferación como en diferenciación son mediados principalmente por PKAII y la subunidad RII β (Calebiro, 2006).

Tras la unión de dos moléculas de cAMP a cada subunidad reguladora, las subunidades catalíticas de a PKA son liberadas y van a difundir hasta el núcleo de forma pasiva, donde van a fosforilar y activar a diversos factores de transcripción. Entre ellos se encuentra la proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP (CREB) que pertenecen a la familia de factores de transcripción con dominio de unión al DNA de cremallera de leucina (bZIP). La fosforilación de CREB por PKA en el residuo de serina 133 va a promover el aumento de su actividad transcripcional al favorecer su unión al DNA y el posterior reclutamiento de histonas acetil-transferasas, como la proteína de unión a CREB (CBP) y/o p300 (Chrivia, 1993; Kwok, 1994). Este factor se fosforila y alcanza su actividad máxima entre los 30 minutos y una hora después del aumento del cAMP (Michael, 2000), decayendo su fosforilación junto a su actividad por el incremento de la acción de las fosfatasas de proteínas 1 y 2A (PP1 y PP2A) (Lazzereschi, 1997).

Se ha demostrado que el factor de transcripción CREB es esencial para el mantenimiento del tiroides adulto, ya que ratones transgénicos expresando un dominante negativo de CREB en las células tiroideas, presentan graves defectos en el tiroides, con folículos aberrantes y que no expresan ningún marcador tiroideo (Nguyen, 2000). Así mismo, células de rata establemente transfectadas con un dominante negativo de CREB, proliferan menos y captan menos I⁻ en respuesta a TSH (Woloshin, 1992).

Estas evidencias demuestran el papel fundamental de la ruta cAMP-PKA-CREB activada por TSH tanto en la proliferación como en la diferenciación de las células tiroideas.

2.2-. Otras vías de señalización activadas por TSH

Pese a la importancia de PKA y CREB en la transducción de la señal inducida por la TSH, la su simple activación no es suficiente para reproducir los efectos de dicha hormona (Dremier, 1997). Así la PLC (Devlin, 2000), las GTPasas RhoA (Medina, 2000a; Kim, 2002) y Rab1, las quinasas mTOR1 (Brewer, 2007), la PI3K/AKT (Cass, 1999; De Gregorio, 2007), la PKC (Park, 2002) y ERK (Nellore, 2009), han sido relacionadas tanto con la proliferación como con la diferenciación inducidas por la TSH, convirtiendo la acción de esta hormona en una compleja red formada por diversas vías de señalización (Medina, 2000a)(Fig 4).

Además de la señalización mediada por la liberación de la subunidad G α s y el aumento del cAMP, la liberación de los dímeros $\beta\gamma$ induce la activación de PI3K/AKT, contrarrestando parcialmente el efecto de la TSH sobre la activación del promotor de NIS (Zaballos, 2008).

2.3-. El factor de crecimiento IGF1

Para que las células tiroideas proliferen correctamente, además de la TSH es necesaria la acción del factor de crecimiento IGF1 o de la insulina. Se ha descrito que en células tiroideas, la insulina ejerce su función a través del receptor de IGF1 ya que los efectos de esta hormona se consiguen a dosis farmacológicas de la misma (Isozaki, 1987). Por ello se acepta que es el IGF1 el que ejerce un papel fisiológico en la proliferación. De acuerdo con lo descrito *in vitro*, ratones transgénicos expresando un receptor de IGF1 inactivo en el tiroides necesitan niveles mayores de TSH (compensatorios) para mantener el tamaño y función de la glándula (Muller, 2011) y ratones transgénicos sobre-expresando el receptor de IGF1 e IGF1 específicamente en el tiroides, presentan un tiroides hiperplásico, pero funcional, en el que la captación de I^- esta aumentada (Clement, 2001). Mientras que los ratones en los que se ha delecionado el receptor de Insulina específicamente en el tiroides no presentan ninguna disfunción en dicha glándula (Ock, 2011).

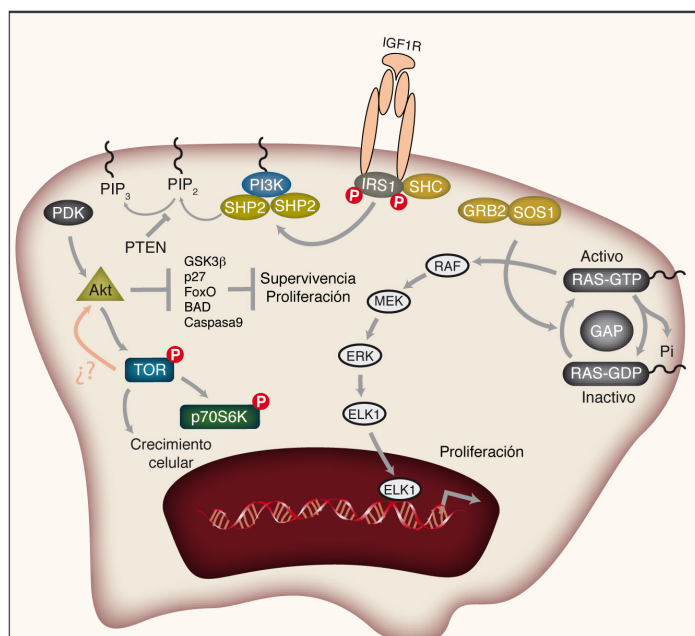


Fig.5-. Vías de señalización activadas por IGF1. Tras la unión de IGF-1 (Factor de crecimiento similar a insulina-1) a su receptor con actividad tirosina quinasa se produce el reclutamiento de proteínas con dominios SH2 como IRS-1 (Sustrato del receptor de insulina-1) que promueve la activación de la enzima PI3K (Fosfoinositol 3'-Kinasa). Esta enzima fosforila a PIP2 (Fosfoinositol-3,4 bisfosfato) para generar el segundo mensajero PIP3 (Fosfoinositol trifosfato). La reacción opuesta es llevada a cabo por la proteína fosfatasa PTEN (Fosfatasa y homólogo de tensina delecionado en el cromosoma 10). PIP3 atrae a Akt/PKB (Proteína Kinasa B) y a la enzima PDK1 (Kinasa dependiente de 3'-fosfoinositidos-1) a la membrana, que junto con mTOR (Diana de rapamicina de mamíferos) promueve la activación de PKB. Además Akt a través activará mTOR estableciendo un bucle de activación positivo. El receptor de IGF1 también reclutará otras proteínas como Shc, que a su vez llevará a la activación de RAS mediante en reclutamiento de Grb2 y SOS. Esto iniciará la cascada de las MAPK, MEK, ERK. Las flechas indican activación y las líneas truncadas inhibición.

Como ya hemos comentado, los efectos biológicos del IGF1 son mediados por su unión al receptor transmembrana con actividad tirosina quinasa IGF1R (Fig 5). La activación de estos receptores va a promover la dimerización de los mismos y su auto-fosforilación en residuos de Tyr/Ser. Estas fosforilaciones inducirán la unión de proteínas adaptadoras como IRS-1 y -2 (Sustrato del receptor de insulina) o Shc (Ariga, 2000) que a su vez activarán diferentes rutas de señalización. La proteína Shc interacciona con las proteínas Grb2 y SOS activando a la GTPasa RAS e iniciando así la cascada de las MAPK que estimula la proliferación celular.

Pero la mayoría de los efectos mediados por el IGF1 y/o la Insulina en células tiroideas, se deben a la activación de la fostatidil inositol 3' quinasa (PI3K) (Saito, 2001). La PI3K, compuesta por una subunidad reguladora p85 y una catalítica p110, se recluta cerca de los receptores de dichos

ligandos por su interacción con la proteína adaptadora IRS-1. La PI3K también puede reclutar miembros de la familia de las GTPasas como Ras aumentando la actividad de PI3K y fosforilando los residuos de fosfatidil inositol di-fosfato (PIP2), anclados a la membrana plasmática, que van a pasar a su forma tri-fosfato (PIP3). La reacción inversa es llevada a cabo por el gen supresor tumoral PTEN (fosfatasa y homólogo de tensina deleciónado del cromosoma 10) que proporciona un mecanismo de finalización de la señal iniciada por PI3K.

El PIP3, va a reclutar a la membrana plasmática a proteínas con dominios PH (homologo a pleckstrina), entre las que están la proteína quinasa B (PKB/Akt) y su quinasa activadora PDK-1 (quinasa dependiente de fosfoinositidos). Akt se activa mediante la fosforilación en el residuo de Thr308 mediado por PDK-1 (Chan, 1999) y en el residuo de Ser473 mediado por el complejo mTOR2/Rictor (Sarbasov, 2005) y se ha descrito que la fosforilación en la Ser473 precede y facilita la fosforilación en la Thr308 (Sarbasov, 2005).

Se han descrito muchas dianas directas de Akt, involucradas en diversos procesos celulares, como la supervivencia y crecimiento celular. Akt fosforila e inhibe proteínas proapoptóticas como BAD (Antagonista de Bcl-2/Bcl-XL, que induce la muerte celular) o la caspasa-9. Además fosforila varias proteínas inhibidoras del ciclo y crecimiento celular, como son los factores FoxO o el inhibidor de ciclo celular p27^{KIP} a los que fosforila excluyéndolos del núcleo (Brunet, 1999; Shin, 2002) o la quinasa GSK3 (glucogeno sintasa quinasa 3) a la que fosforila e inhibe (Cross, 1995) y activa a mTOR1 que se ha relacionado con la síntesis de proteínas (Scott, 1998).

3-. Regulación de la proliferación por TSH e IGF1

La glándula tiroidea es un tejido poco proliferativo. Durante el desarrollo embrionario, pasa por una fase de alta proliferación alrededor del día 15.5 en ratón (Fagman, 2006) y del 44-48 (Trueba, 2005) en humano, a la que sigue la fase de foliculogénesis. A partir de ahí la tasa proliferativa va disminuyendo, y en el tiroides adulto solo un 1-2% de las células foliculares se están dividiendo. Pese a esto, la TSH y el IGF1 son necesarios para el mantenimiento de la función tiroidea.

La TSH, el IGF1 o la insulina regulan la proliferación de las células foliculares de forma conjunta induciendo la entrada en G1 y la transición G1-S (Tramontano, 1986b; Brenner-Gati, 1988; Burikhanov, 1996; Kimura, 1999)(Fig.6). Se ha descrito que TSH induce la síntesis de DNA a través de la activación de PKA/CREB (Woloshin, 1992; Kimura, 1999), de las vías de mTOR/Raptor (Cass, 1999) y de la PLD/PKC (Fujimoto, 1992; Kim, 2002). Por otro lado, IGF1 induce la entrada en fase S activando la cascada PI3K/AKT (Saito, 2001) y otras quinasas como las MAPK (Burikhanov, 1996) o mTOR/Raptor (Blancquaert, 2010). Pero solo la acción conjunta de ambos estímulos logra una síntesis eficiente de DNA, al ejercer un efecto sinérgico. Se piensa que este efecto se logra mediante la activación de rutas comunes, integrando y potenciando la señal iniciada por los dos factores, pero aún no se han

descrito la vía o vías de señalización implicadas. Una vía candidata es la vía de mTOR/Raptor, que se activa en respuesta a TSH y a IGF1 (Blancquaert, 2010) y otras mas controvertidas son la vía de las MAPK quinasas o la vía de PI3K/Akt, aunque existen datos contradictorios acerca de su activación en respuesta a TSH (Ariga, 2000; Vandeput, 2003; Brewer, 2007; De Gregorio, 2007; Zaballos, 2008; Vuchak, 2009).

En las células tiroideas de rata usadas en este estudio (FRTL5 y PCCI3), la entrada en fase G1/S en respuesta a TSH e IGF1 viene dada por la inducción de los genes c-fos y c-myc (Tramontano, 1986a; Isozaki, 1987; Pirson, 1996)(Fig 6), que se expresan a las pocas horas de la adicción de los estímulos. Estos van a activar la expresión de las ciclinas de fase G1 temprana, ciclinaD1 y 3, y de las CDKs 4 y 2 (Van Keymeulen, 1999; Lewis, 2004; Paternot, 2006; Fukushima, 2008). Los complejos CiclinaD/CDK4 comenzarán a fosforilar e inhibir a la proteína de Retinoblastoma Rb (Medina, 2000c), quedando activados los factores de transcripción de la familia E2F, que inducirán la expresión de la ciclina de fase G1 tardía ciclinaE y otros genes relacionado con las síntesis de DNA (Lewis, 2004). La degradación del inhibidor de ciclo p27 también en respuesta a TSH y a IGF1(Medina, 2000c; Fukushima, 2008), permitirá la actividad máxima de los complejos ciclinaD/CDK4 y ciclinaE/CDK2 (Lewis, 2004), que al inhibir completamente a Rb promoverán la expresión de todos los genes necesarios para la entrada en fase S.

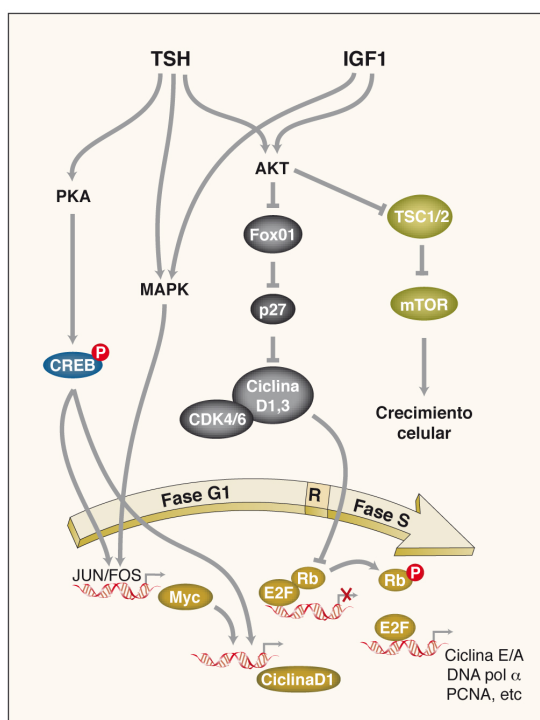


Fig.6.- Regulación de la transición G1/S en respuesta a TSH e IGF1.

La activación de la vía PKA y MAPK en respuesta a TSH e IGF1 induce la expresión de genes tempranos como cmyc y cfos que activarán la expresión de las ciclinas D necesarias para la entrada en G1. La activación de Akt inducirá la inhibición de FoxO y de su gen diana p27Kip, que se encontraba inhibiendo los complejos ciclinaD/CDK4/6. Una vez activos estos últimos inhibirán a la proteína Retinoblastoma (Rb) lo que permitirá la actividad del factor de transcripción E2F, que activará la expresión de genes necesarios para la síntesis de DNA.

También se han descrito estímulos inhibitorios de la proliferación de los tirocitos, como son la somatostatina o el TGFβ. La somatostatina secretada por las células parafoliculares (Van Noorden, 1977) y actuando sobre sus receptores expresados en los tirocitos, interfiere con la proliferación mediada por la TSH y el IGF1 al prevenir la degradación de p27 (Tsuzaki, 1990; Florio, 1996; Medina, 2000c), mientras que el TGFβ ejerce un efecto citostático al inhibir la proliferación inducida por la TSH

mediante un mecanismo aun desconocido (Cirafici, 1992) y la inducida por el IGF1 interfiriendo la activación de las MAPK (Mincione, 2003).

Uno de los objetivos de nuestro laboratorio es identificar las señales reguladas de forma conjunta por la TSH y el IGF1 para promover la proliferación. En este aspecto, el trabajo recientemente publicado y llevado a cabo por el Dr. Zaballos (Zaballos, 2013), describe la regulación del factor de transcripción FoxO1 por TSH e IGF1. Este factor de transcripción ha sido relacionado con la regulación de la proliferación y es responsable de la expresión de p27^{KIP}. FoxO1 es excluido del núcleo en respuesta a TSH e IGF1 de forma PI3K/Akt-dependiente, lo que coincide con la disminución de la actividad del promotor de p27 y el aumento de la proliferación celular. Por tanto dicho trabajo reporta datos a favor de la participación de la vía PI3K en la proliferación inducida por TSH e IGF1 en células tiroideas de rata, a través de la regulación de FoxO1 y es un claro ejemplo de la acción coordinada de estos dos estímulos. Otros intermediarios, aún no identificados, podrían estar implicados en la acción conjunta de la TSH y del IGF1 sobre la proliferación celular.

4-. Regulación de la diferenciación por TSH e IGF1

La expresión de los factores de transcripción tiroideos comienza el día E8.5 del desarrollo embrionario de ratón y es independiente de la TSH ya que esta hormona no se secreta en la hipófisis hasta el día E15.5 (Postiglione, 2002), fecha en que también comienza la expresión del TSHR en las células tiroideas (Lazzaro, 1991). En la glándula tiroidea adulta, aún en ausencia de TSH y de su receptor, se mantiene la expresión de los factores de transcripción tiroideos (Postiglione, 2002). Pero existen numerosos estudios realizados *in vitro* que demuestran que Pax8 (Medina, 2000b; Mascia, 2002) y FoxE1 (Ortiz, 1997) se expresan en respuesta a la TSH y además el ratón que expresa un dominante negativo de CREB en el tiroides, pierde la expresión de todos ellos (Nguyen, 2000), por lo que se ha sugerido que existen señales que estarían compensando la ausencia de TSH y de su receptor *in vivo* (De Felice, 2004). Es aceptado que la TSH regula la expresión al menos de Pax8 y FoxE1, presumiblemente a través de CREB, aunque se necesitan más estudios para confirmar esta regulación *in vivo*. En cuanto a la expresión de Nkx2-1 no depende de TSH, y se ha descrito que TSH o inhibe (Saito, 1997; Medina, 2000b) o no afecta su expresión (Van Renterghem, 1995) dependiendo del sistema celular utilizado.

A pesar de las lagunas existentes en la regulación de los FT tiroideos, se ha demostrado que TSH y su receptor son fundamentales para la expresión de los genes de diferenciación TPO y NIS y en menor medida de Tg y del receptor de TSH (Marians, 2002; Postiglione, 2002). Esta regulación estaría mediada por Pax8, FoxE1 y Nkx2-1, a través de sitios de unión de estos FT presentes en los promotores de los genes de NIS (Ohno, 1999), TPO (Zannini, 1992), Tg (Espinoza, 2001) y TSHR (Civitareale, 1993) (Fig 7).

La TSH además de regular la expresión de Pax8 y FoxE1, regula la actividad y la unión al DNA de Nkx2-1 y Pax8 mediante la inducción de modificaciones postraduccionales como fosforilaciones (Velasco,

1998) o cambios en el estado redox de la célula respectivamente (Kambe, 1996). Además Pax8 y Nkx2-1 interaccionan físicamente y activan de forma conjunta la expresión del promotor de Tg (Di Palma, 2003). De esta forma la TSH regulando la expresión y actividad de los FT tiroideos, promueve la expresión de todos los genes de diferenciación, menos la del TSHR cuya expresión disminuye en respuesta a TSH.

Pax8 es uno de los factores de diferenciación clave. *In vivo* Pax8 es fundamental para la proliferación y supervivencia de los precursores tiroideos y regula la expresión de FoxE1 y Hhex (Mansouri, 1998). En el tiroides adulto resultados sin publicar del laboratorio del Dr. Di Lauro, han demostrado que es necesario para la diferenciación de las células foliculares (Marotta P 2012) y resultados *in vitro* obtenidos con células diferenciadas han demostrado que es necesario para la expresión de NIS, TPO, Tg y de la desiodasa 1(DIO1) ((Ruiz-Llorente, 2012) y datos sin publicar). Presenta sitios de unión en los promotores de estos cuatro genes y pese a que Nkx2-1 también participa en la regulación de NIS, TPO y Tg, se ha demostrado que tiene un papel limitante (Pasca di Magliano, 2000).

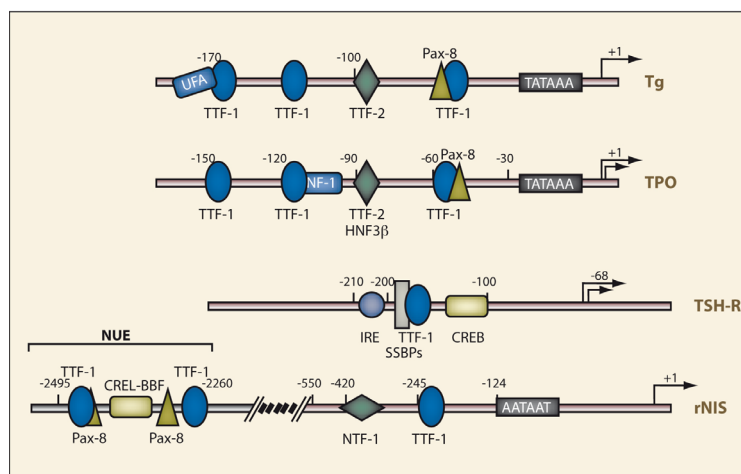


Fig.7.- Promotores de los genes específicos de la glándula tiroides. Representación esquemática de la región promotora de los genes *TG*, *TPO*, *TSHR* y *Nis*, donde se indica de manera aproximada la localización de los sitios de unión al promotor de los factores de transcripción Nkx2-1, FoxE1 y Pax8. Se puede observar como la región promotora de la TG y la TPO son similares. La región más importante en la regulación de la expresión de Nis es la región NUE (Nis Upstream Enhancer). Los números indican la posición de estos sitios con respecto al inicio de la transcripción (-1). También se representa la caja TATA en los promotores de TG, TPO y NIS.

Se conoce poco acerca de la regulación de la expresión de Pax8. Durante el desarrollo embrionario se sabe que está regulado por Hhex y Nkx2-1 y que en células diferenciadas su expresión se induce en respuesta a TSH a través de la activación de PKA (Medina, 2000b; Mascia, 2002). Se ha descrito un sitio de unión de Nkx2-1 en su región promotora (Nitsch, 2010) y su expresión se encuentra reducida en células que expresan un dominante negativo de Nkx2-1 (Christophe-Hobertus, 2012). Sin embargo y a pesar de su importancia en la diferenciación tiroidea, no se conocen en detalle los mecanismos implicados en su regulación por TSH.

Uno de los genes de diferenciación más importantes regulado por Pax8 es NIS. Dado el importante papel de NIS en la fisiología tiroidea y su uso diagnóstico y terapéutico, por su capacidad

de captar yodo radiactivo, se han dedicado muchos esfuerzos a estudiar la regulación de su expresión. En su región promotora se ha descrito una secuencia denominada NUE de “NIS Upstream Enhancer” que es fundamental para la expresión de NIS y que contiene dos sitios de unión de Pax8, dos sitios de unión de Nkx2-1 y un sitio degenerado de unión a CREB, *CRE-like* (Chun, 2004). La unión de Pax8 al promotor de NIS es fundamental para su expresión, siendo el papel de Nkx2-1 menos importante y la sola expresión de Pax8 es suficiente para lograr la re-expresión de NIS en algunos tipos tumorales (Mu, 2012). Además de Pax8, se ha descrito que la activación de PKA inducida por TSH ejerce un efecto aditivo sobre la expresión de NIS, pudiendo haber modificaciones postraduccionales u otros factores implicados (Chun, 2004). Por el contrario la activación de oncogenes como BRAF o la activación de las vías de las MAPK, Smad o PI3K por factores secretables como TGF β o IGF1 en los carcinomas tiroideos más indiferenciados (Costamagna, 2004; Riesco-Eizaguirre, 2006; Kogai, 2008) llevan a la pérdida de la función de NIS.

IGF1 tiene un papel minoritario en la diferenciación tiroidea. Se ha descrito que aumenta la expresión de FoxE1 (Ortiz, 1997) y que inhibe la activación de NIS en respuesta a TSH a través de la activación de PI3K (Garcia, 2002), por lo que se acepta que el IGF1 tiene un papel predominante en la regulación de la proliferación de las células foliculares tiroideas y que la TSH tiene un efecto dual y crítico tanto en proliferación como en diferenciación.

5-. Cáncer de tiroides

5.1-. Clasificación

El cáncer de tiroides es un tipo de tumor endocrino muy frecuente, cuya incidencia ha ido en aumento durante los últimos años. Puede originarse a partir de las células parafoliculares (3-7%) dando lugar a carcinomas medulares, pero la gran mayoría se originan a partir de células foliculares (Elisei, 2012). Estas pueden dar lugar a tumores benignos y malignos (Nikiforov, 2011)(Fig 8).

Los adenomas tóxicos son tumores benignos que producen un exceso de HT y prácticamente no evolucionan a malignidad. Los adenomas foliculares son tumores benignos, generalmente encapsulados y diferenciados, que suponen la neoplasia más frecuente y que raramente evolucionan a malignidad. Los tumores malignos se clasifican en tumores diferenciados, pobremente diferenciados o indiferenciados. Los carcinomas diferenciados son los más frecuentes y se clasifican en carcinomas papilares (CPT) o carcinomas foliculares (CFT). Están encapsulados y expresan Tg y NIS por lo que son capaces de captar yodo, lo que facilita su tratamiento con yodo radiactivo. El CPT es la neoplasia maligna más frecuente (80%). Se caracteriza por formar papilas, tener una morfología nuclear específica y por la aparición de metástasis linfáticas locales. El CFT es menos frecuente (15-20%), presenta morfología folicular y se caracteriza por la aparición de

metástasis a distancia en pulmón y hueso. En general estos tumores son tratables y tienen muy buen pronóstico, pero en ocasiones aparecen metástasis refractarias al I¹³¹ radiactivo, lo que dificulta su tratamiento. Estos tumores pueden perder marcadores de diferenciación y pasar a ser carcinomas pobremente diferenciados (CPDT) o anaplásicos (CAT). Estos son tumores muy raros (2% y 1-2% respectivamente) altamente malignos, no están encapsulados, presentan extensión extra-tiroidea y metástasis a distancia en hueso, pulmón, hígado y cerebro. Al no presentar rasgos de diferenciación no se pueden tratar con yodo radiactivo, y son altamente letales. En este tipo de carcinomas se encuentran áreas diferenciadas con fenotipo de CPT o CFT lo que apoya la idea de que los CPDT y CAT derivan de CPT o CFT pre-existentes.

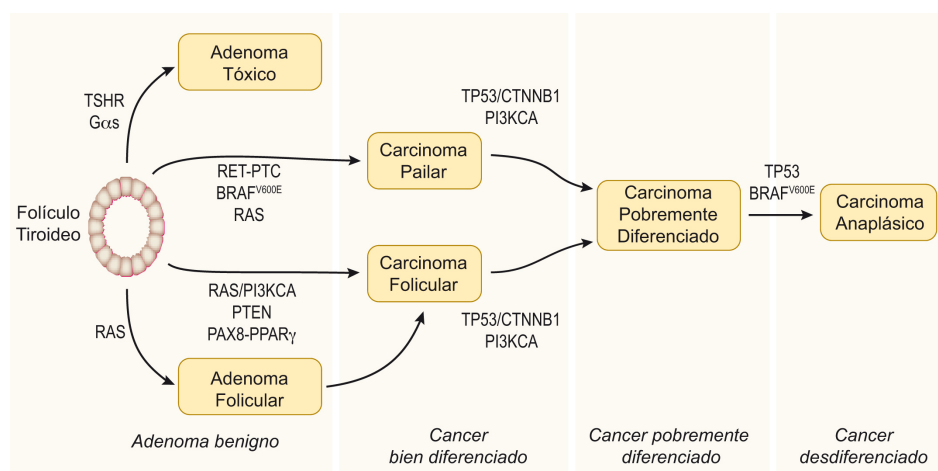


Fig.8-. Modelo escalonado de la carcinogénesis tiroidea. Este modelo está basado en características histológicas, clínicas y en el grado de diferenciación de los tumores. Las células foliculares tiroideas bien diferenciadas pueden dar lugar a tumores tanto benignos como malignos. Los adenomas tóxicos son tumores benignos que están asociados con mutaciones activadoras de los genes de TSHR o $G\alpha_s$. Tras sufrir mutaciones en diferentes oncogenes y genes supresores tumorales, las células foliculares tiroideas también pueden dar lugar a carcinomas papilares o foliculares bien diferenciados, carcinomas pobremente diferenciados y carcinomas anaplásicos. La figura representa un modelo esquemático mostrando los eventos moleculares involucrados. Modificada de (Nikiforov, 2011)).

5.2-. Alteraciones genéticas en cáncer de tiroides

La TSH actuando a través de la vía del cAMP/PKA y el IGF1 activando las vías de la PI3K/AKT y MAPK regulan la proliferación y diferenciación de las células foliculares. Por ello no es de extrañar que sean mutaciones en componentes de estas vías de señalización las que estén implicadas en la iniciación y progresión de los tumores tiroideos (Fig 9).

Actualmente existen dos modelos que explican el carcinoma de tiroides, el modelo clásico de acumulación de mutaciones (Riesco-Eizaguirre, 2007; Nikiforov, 2011) y la nueva hipótesis de las células madre tumorales (Thomas, 2008).

Según el modelo clásico las mutaciones iniciadoras van a definir el tipo de carcinoma. Mutaciones activadoras del receptor de TSH o de las proteínas $G\alpha_s$, que llevan a una activación constitutiva de la AC, producen adenomas tóxicos que no evolucionan a malignidad. La aparición de mutaciones activadoras de la vía de la **PI3K/AKT** como aquellas en los oncogenes NRAS, KRAS y H-RAS o el reordenamiento cromosómico PAX8/PPRA γ llevan a la formación de AF o CFT. Por otro lado,

las mutaciones que llevan a la activación de la vía de las **MAPK** van a promover la aparición de CPT. Dentro de estas mutaciones, las más frecuentes son la mutación V600E de BRAF, las de RAS y reordenamiento cromosómico RET/PTC. Tanto en CPT como en CFT, las mutaciones iniciadoras son excluyentes.

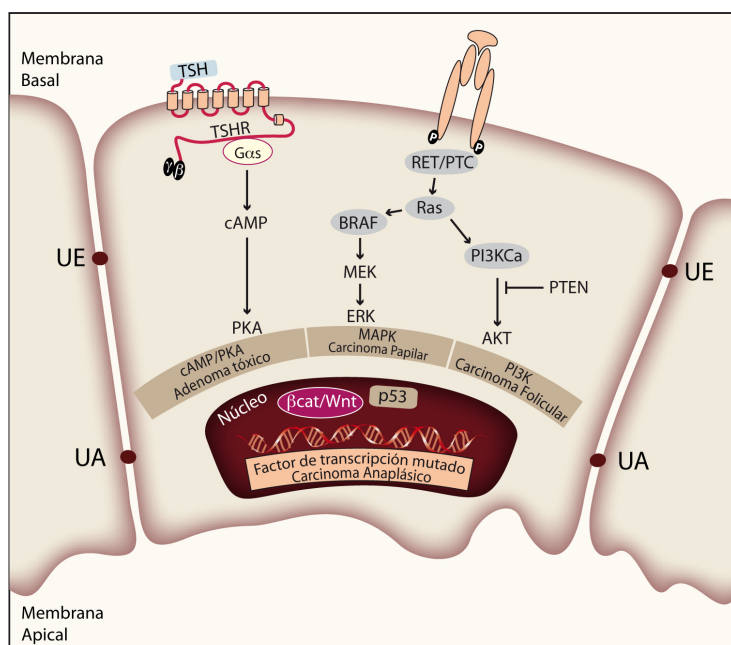


Fig.9. Vías de señalización y alteraciones genéticas implicadas en la carcinogénesis tiroidea. El tipo de tumor tiroideo depende de la permanencia de la vía hiperactivada. Se han descrito tres vías distintas para explicar la proliferación tumoral de la célula folicular tiroidea. Mutaciones activadoras del TSHR y Gαs llevan a la activación constitutiva de la vía cAMP/PKA y dan lugar a adenomas tóxicos que no progresan a malignidad. Reordenamientos en RET y mutaciones en BRAF producen la hiperactivación de la vía MAPK y son eventos iniciadores del CPT. Mutaciones en la unidad catalítica de PI3K, AKT y mutaciones inactivadoras o deleciones en PTEN producen una hiperactivación de la vía PI3K y están implicados en el inicio del CFT. Mutaciones en RAS (que activa ambas vías) están presentes en CPT y CFP. Mutaciones en βcatenina y su acumulación nuclear así como la inactivación de p53 se hallan exclusivamente en el carcinoma anaplásicos y están implicados en la progresión tumoral.

La aparición de segundas mutaciones va a promover la progresión hacia carcinoma pobremente diferenciado o anaplásico. Cada día aparecen más evidencias que apunta a que es necesaria la sobre-activación de la vía PI3K para promover esta transición. Así la mutación activadora de PI3KCA, la ganancia cromosómica de Akt o la pérdida de función, deleción o silenciamiento de PTEN, parecen ser eventos necesarios (Garcia-Rostan, 2005; Santarpia, 2008; Ricarte-Filho, 2009).

Otros eventos tardíos que aparecen en los CPDT y CAT son mutaciones en el gen supresor tumoral *TP53* o en el gen de βcatenina, *CTNNB1* (Fagin, 1993; Garcia-Rostan, 1999; Garcia-Rostan, 2001). Estas mutaciones aparecen mas frecuentemente en CAT que en CPDT y no se encuentran nunca en carcinomas diferenciados.

La hipótesis de las células madre tumorales propone la existencia de distintas clases de células madre adultas que derivan de tres tipos de células tiroideas fetales denominadas: células madre tiroideas, tiroblastos y protirocitos (Thomas, 2008; Lin 2011). Estas células madre son las que van a sufrir las mutaciones y a originar las células madre tumorales que darán lugar a los distintos carcinomas malignos. Recientemente el grupo de Todaro ha conseguido aislar células madre humanas procedentes de CPT, CFT y CAT y caracterizarlas (Todaro, 2010). Estas poseen características de células madre y son capaces de reproducir el tumor original. Además han descrito la implicación de vías de señalización como la de HGF/Met, PI3K/Akt o Wnt/βcatenina, implicadas en CSC de otros tejidos. Pese a la identificación de células madre tumorales, no hay evidencias que demuestren la

existencia de las células madre de origen fetal en el tejido normal, por lo se necesitan mas estudios para demostrar esta hipótesis.

5.3-. Progresión tumoral

5.3.1-. Senescencia inducida por oncogenes

Cuando una célula normal comienza a proliferar de forma descontrolada por la aparición de mutaciones en oncogenes, la célula va a sufrir un estrés replicativo denominado estrés oncogénico que va a desencadenar la senescencia celular. La senescencia es un estado de quiescencia provocado por al menos tres mecanismos: acortamiento telomérico (Collado, 2007), mutaciones en oncogenes o la acumulación de daño al DNA.

Las células tumorales senescentes son incapaces de proliferar por lo que la senescencia es una barrera para la progresión tumoral. En las lesiones pre-malignas casi todas las células son senescentes, lo que explica su lento crecimiento y baja malignidad (Michaloglou, 2005). La expresión de supresores tumorales como p16^{INK4a}, p14^{ARF} o p53 (Chin, 1999) se activa en respuesta a este estrés oncogénico y se induce la senescencia. Su falta de expresión o inactivación se ha asociado a la pérdida de senescencia y con ello a la progresión hacia malignidad.

Los tumores malignos, pese a que pierden la capacidad de ser senescentes, pueden ser forzados a volver a ella si se restauran vías de señalización y supresores tumorales previamente deshabilitados. Las células tumorales senescentes son rápidamente eliminadas por las células del sistema inmune, resultando en una regresión tumoral eficiente (Xue, 2007; Rakhra, 2010). Por ello la senescencia constituye una diana prometedora para el desarrollo de nuevas terapias. La reinducción de p53 con drogas como *Nutlin* (Vassilev, 2004), la inactivación de c-myc (Wu, 2007b) o la re-expresión de p27^{KIP} mediante inhibidores del proteasoma (Lin, 2010), suponen claros ejemplos de regresión tumoral por la inducción de la senescencia.

Al igual que en el resto de tipos tumorales, los primeros estadios del cáncer de tiroides se caracterizan por la aparición de marcadores de senescencia como SA-β-gal (β-galactosidasa asociada a senescencia), p16^{INK4} o p21^{CIP}, que no se encuentran en tumores más agresivos y desdiferenciados, como los anaplásicos (Vizioli, 2011) que a su vez portan mutaciones en p53 (Fagin, 1993). Por lo que los tumores más indiferenciados han escapado de la senescencia y la reinducción de la misma podría ser una diana terapéutica contra este tipo de tumores.

5.3.2-. Metástasis y transición epitelio mesénquima

Tras superar la barrera de la senescencia la invasión de los tejidos adyacentes es considerado un paso esencial en el proceso de malignización de los tumores, que lleva a la formación de las metástasis a distancia, causa de la letalidad de muchos tumores (Peinado, 2007; Polyak, 2009). La

invasión tumoral está controlada por una serie de procesos moleculares y celulares coordinados que permiten a las células disociarse y migrar desde el tumor primario. Los cambios en adhesión y migración durante la invasión tumoral se asemejan a los ocurridos durante el desarrollo embrionario en un proceso denominado transición epitelio-mesénquima (del inglés “EMT”). Durante este proceso las células pierden sus características de células epiteliales y adquieren un fenotipo mesenquimal adquiriendo la capacidad de migrar e invadir. Un marcador de este proceso es la pérdida de expresión de la cadherina epitelial, E-cadherina (gen *CDH1*), considerado un gen supresor de la invasión tumoral. La inhibición de la expresión de este gen es mediada por diversos factores de transcripción como Snail (*SNAI1* y *SNAI2*), ZEB (*ZEB1* y *ZEB2*), factores de transcripción de la familia bHLH (*E47* y *TWIST*) y *TCF4*, que a su vez se encuentran sobre-expresados en los tumores en respuesta a señales extracelulares (HGF, TGF β , FGF o Wnt entre otros) o por la activación de oncogenes (*RAS* o *BRAF* entre otros). En conjunto, los propios oncogenes junto con los factores secretados por las células tumorales o el ambiente tumoral, van a inducir el fenotipo mesenquimal que favorece la invasividad y la aparición de metástasis. Además de la pérdida de E-cadherina el fenotipo mesenquimal se va a caracterizar por la aparición de otros marcadores como la fibronectina, la vimentina o la N-cadherina.

Durante la progresión tumoral del cáncer de tiroides se ha descrito que las células epiteliales pierden la polaridad y la estructura folicular (Liu, 2011) por la falta de expresión de marcadores apicales como la ocludina o la claudina (Tzelepi, 2008) y de marcadores basolaterales como la E-cadherina o la cadherina-16, específica de riñón y tiroides (Brabant, 1993; Cali, 2012). La expresión de las cadherinas se ha relacionado de forma inversa con el grado de diferenciación del tumor, de forma que los CPT y CFT expresan niveles bajos de cadherinas en membrana, apareciendo con frecuencia en el citoplasma, mientras que los CTPD y los CAT pierden completamente su expresión (Brabant, 1993; Cali, 2012; de Cristofaro, 2012).

La represión de la expresión de E-cadherina y la adquisición de un fenotipo mesenquimal en CPT ha sido relacionado con la expresión del oncogén *BRAF* y la secreción de TGF β (Riesco-Eizaguirre, 2009; Knauf, 2011), siendo la secreción de TGF β un evento esencial para una completa EMT y que da lugar a CTPD. Además la expresión de *SLUG* y *TWIST 2* solo se encuentra en carcinomas anaplásicos (Buehler, 2012). De forma que la activación del programa de EMT se ha asociado a los carcinomas de tiroides más agresivos.

6-. Vías Wnt

Las proteínas Wnt son una familia muy conservada de glicoproteínas solubles ricas en cisteína, codificadas por 19 genes en ratón y humano. Estas proteínas tienen funciones muy importantes durante el desarrollo embrionario, ya que regulan procesos clave como la proliferación, la

especificación, la polaridad celular y el patrón de los tejidos. En adultos, estas proteínas están implicadas en la homeostasis de los tejidos, ya que controlan la proliferación, activación y regeneración de las células madre y las vías que activan se encuentran alteradas en muchos tipos de tumores (Clevers 2006).

Las proteínas Wnt transducen su señal mediante tres vías de señalización distintas: la vía canónica, o vía β catenina-dependiente y las vías no canónicas o β catenina-independientes: WNT/ Ca^{2+} y WNT/PCP (Polaridad planar celular)(Fig 10).

6.1-. Vía Wnt/ β catenina

Cuando no hay factores Wnt, β catenina, el efector y principal componente de esta vía, se encuentra formando parte de las uniones adherentes, uniéndose a E-cadherina y α -catenina y modulando el citoesqueleto de actina. La proteína no unida a la membrana, localizada en el citoplasma, es constantemente degradada por un complejo proteico denominado complejo de destrucción, formado por las proteínas de andamiaje APC (Adenomatosis polyposis coli) y Axina y las quinasas CK1 (Caseína quinasa 1) y GSK3 β (Rubinfeld, 1996). Estas dos quinasas fosforilan de forma secuencial a la β catenina haciendo que ésta sea reconocida y ubiquitinada por la ubiquitina ligasa β Trcp y consecutivamente degradada por el proteasoma. Cuando hay bajos niveles de β catenina en el citoplasma, los factores de transcripción TCF/LEF (factor de células T/ factor activador de linfocitos) se encuentran reprimiendo a sus genes diana por el reclutamiento de co-represores transcripcionales de la familia TLE/Groucho (del inglés "*transducin-like enhancer of split*").

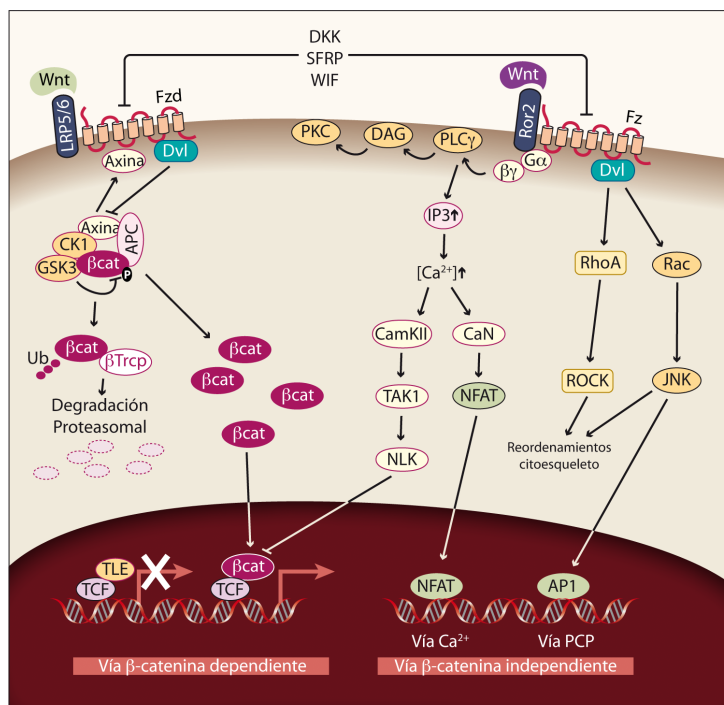


Fig.10-. Vías de señalización Wnt. Izquierda: vía de señalización Wnt canónica o β catenina dependiente. En células no expuestas a factores Wnt, la β catenina citoplasmática es degradada y las proteínas TLE/Groucho se encuentran reprimiendo sus genes diana. Cuando la vía es activada por la unión de un factor Wnt canónica a su receptor Fzd y a su co-receptor LRP5/6, se reduce la degradación de β catenina y esta se acumula en el citoplasma. Como consecuencia, β catenina entra en el núcleo, se une a los factores de transcripción TCF/LEF y activa transcripción. **Derecha: vías de señalización no canónicas o β catenina independientes: vía del Ca^{2+} y vía de la polaridad planar celular (PCP).** La unión de un factor Wnt no canónico a los receptores Fzd y a Ror2 activa de dos vías de señalización diferentes. La vía del Ca^{2+} promueve la activación de la PKC vía G-PLC γ y modula la adhesión y motilidad celular activando la calcio-calmodulina quinasa (CamKII) y la fosfatasa calcineurina (CaK). La vía PCP modula el citoesqueleto de a través de la activación de las GTPasas pequeñas RhoA y Rac y sus efectores Rock y JNK.

La vía Wnt-canónica se activa cuando un factor Wnt como Wnt1, Wnt3 o Wnt3A se unen a su receptor Fz (Frizzled) y a su co-receptor LRP5/6 (proteína relacionada con el receptor de LDL 5/6). La formación del complejo Wnt-Fz-LDR va a promover la interacción de la proteína citoplasmática de andamiaje Dvl (Dishevelled) con el extremo citoplasmático de Fz. Esta interacción va a inducir primero, el reclutamiento de Axina a la membrana plasmática y segundo, la fosforilación del extremo citoplasmático de LRP5/6. Se ha propuesto que esta fosforilación es mediada por GSK3 α/β y CK1, que son reclutadas a la membrana plasmática (Davidson, 2005; Zeng, 2005) y que esta fosforilación va a facilitar la unión de Axina a LRP5/6, estableciendo un bucle positivo de activación. La Axina es el componente limitante del complejo de destrucción (Lee, 2003), con lo que éste se va a desestabilizar y la β catenina se va a acumular en el citoplasma translocándose al núcleo a través de mecanismos aún no bien identificados. En el núcleo, β catenina se va a unir a los factores de transcripción TCF/LEF desplazando a los co-represores TLE/groucho (Daniels, 2005) y se van a reclutar co-activadores transcripcionales como p300/CBP o Bcl9/Pygo (Mosimann, 2009), activando genes que contienen secuencias de respuesta a Wnt.

Los genes diana clásicos de la vía Wnt, incluyen genes de ciclo celular, como son la ciclinaD1 o el oncogen cMyc (He, 1998; Tetsu, 1999), pero también incluyen genes de la propia vía Wnt como *Axina2*, *DKK1*, *LEF1* (que van a facilitar el apagado de la señal mediada por Wnt), genes involucrados en transición epitelio mesenquima (EMT) como las metaloproteasas de matriz 2 (*MT1-MMP*), *MMP7*, *MMP9* (Brabletz, 1999; Wu, 2007a), *TWIST* o *SLUG* (Howe, 2003; Sakai, 2005) y genes implicados en diferenciación como la Queratina1 (*K1*) o la citoqueratina de pelo 13 (*AE13*) (Merrill, 2001).

6.2-. Vías no canónicas

Hay dos vías β catenina independientes la vía del Ca²⁺ y la vía de PCP. La activación de estas vías está mediada por factores Wnt como Wnt4, Wnt5A o Wnt11 de manera específica de tejido y dependiente del contexto. La vía de la PCP se activa a través de varios de los receptores Fz y activa las proteínas de unión a GTP RhoA y Rac y a sus efectores la Rho-quinasa y JNK. Esta vía está implicada en el establecimiento de la polaridad de los tejidos, migración celular y organización del citoesqueleto. Se describió en *Drosophila* y aunque su relevancia no ha sido plenamente demostrada, existen evidencias de que se conserva en vertebrados (Wada, 2009). La vía del Ca²⁺ se activa a través de los receptores Fz 2 y 7 o del receptor Ror2 (receptor huérfano 2 con actividad tirosina quinasa). Estos receptores activan a la proteína quinasa C (PKC) y aumenta los niveles de Ca²⁺ intracelular, lo que a su vez activa a la Ca²⁺ calmodulina quinasa II (CaMKII) y a calcineurina (CaN) que regulan la migración y proliferación celular (Nishita, 2010).

6.3-. Inhibidores de Wnt

La activación de la vía Wnt esta muy regulada y existen dos familias de antagonistas: "*Dickkopf* " (DKK) y SFRP (del inglés "*secreted frizzled-related protein*"). La familia DKK es un grupo de cuatro proteínas solubles que se unen a LRP impidiendo la formación del complejo Wnt-Fz-LRP necesario para la activación de la vía Wnt. Las SFRP son glicoproteínas solubles que inhiben la vía Wnt secuestrando a las proteínas Wnt y evitando que se unan a sus receptores. Otros inhibidores son WIF y Soggy1. La función fisiológica de estas proteínas es inhibir la vía Wnt de manera temporal y dependiente de tejido durante el desarrollo así como en los tejidos adultos. Por ello se consideran supresores tumorales y su expresión se encuentra silenciada en diferentes tipos de tumores (Gonzalez-Sancho, 2005).

6.4-. β catenina

β catenina lleva a cabo dos funciones completamente distintas, una estructural formando parte de las uniones adherentes y otra en señalización actuando como activador transcripcional en respuesta a los factores Wnt. Esto es posible gracias a su estructura. La proteína β catenina está altamente conservada entre rata, ratón y humano. Está formada por 781 amino ácidos y consiste en un dominio central formado por 12 repeticiones armadillo, flanqueadas por los dominios N- y C-terminal, NTD y CTD respectivamente, y una hélice denominada hélice-C, que se localiza en la última repetición armadillo (Xing, 2008)(Fig 11). La hélice-C es fundamental para la actividad transcripcional de β catenina, aunque no para la adhesión celular, ya que muchos co-activadores transcripcionales interactúan con este dominio (Mosimann, 2009). Las repeticiones armadillo forman un área de andamiaje, por el cual β catenina interactúa con las distintas cateninas-cadherinas, componentes del complejo de destrucción y factores de transcripción (Huber, 1997) (Fig.11 A). Muchas de las proteínas que interactúan con β catenina, tienen dominios de unión que solapan y de esta forma no se puede unir más de una proteína, delimitando así la función de la β catenina. Esto es lo que ocurre con los sitios de unión de APC, E-cadherina y TCF/LEF.

La β catenina sintetizada de *ново* y que no forma parte de las uniones adherentes, se va a degradar por las consecutivas fosforilaciones en el CTD mediadas por CKI y GSK3 β (S45 y S33/37/T41 respectivamente)(Fig.11 B). Pero la función de β catenina también se puede regular mediante fosforilaciones, las cuales van a modificar su interacción con las uniones adherentes y actividad. Las fosforilaciones en la cola citoplasmática de las cadherinas pueden favorecer o debilitar la interacción con β catenina (Choi, 2006; Dupre-Crochet, 2007), pero las fosforilaciones de β catenina generalmente van a debilitar su unión a las cadherinas, favoreciendo su actividad en el núcleo. Por ejemplo, la activación de c-src o el receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR) promueven la fosforilación de β catenina en el residuo Y654 (Piedra, 2001; van Veelen, 2011) localizado en la

última repetición armadillo, lo que reduce su interacción con las cadherinas e incrementa su actividad transcripcional. Además la fosforilación en este residuo promueve un cambio conformacional del extremo C-terminal de β catenina permitiendo que sea fosforilado por otras quinasas como PKA o Akt que la fosforilan en otros residuos como la S675, localizada en la hélice-C, o la S552 (Piedra, 2001; Hino, 2005; Taurin, 2006; Fang, 2007; van Veelen, 2011).

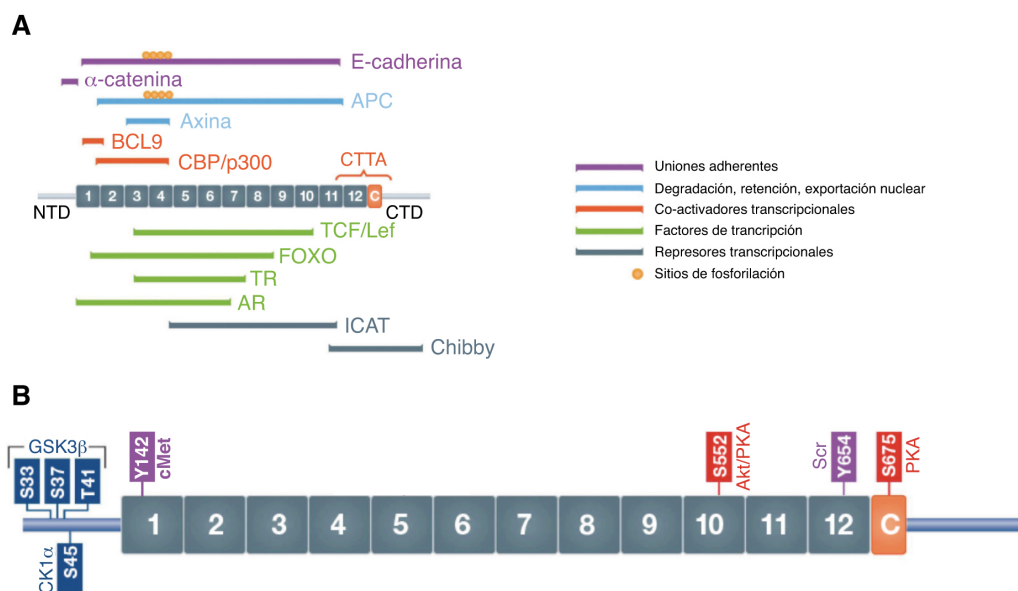


Fig-11-. Estructura de la β catenina. **Panel A:** La proteína β catenina consiste en una región central compuesta por 12 repeticiones armadillo (cajas numeradas), rodeadas por un dominio amino-terminal (NTD) y un dominio carboxilo-terminal (CTP). Entre la última repetición armadillo y la parte flexible del CTD está la hélice-C conservada (C). Las barras de colores muestran los sitios de unión con sus proteínas de interacción (TR: receptor hormonas tiroideas; AR: receptor andrógenos). **Panel B:** Representación esquemática de los residuos regulables por fosforilación de β catenina. Aquellos en azul promueven su degradación y aquellos en rojo y morado incrementan su actividad. Modificada de (Valenta, 2012).

La fosforilación de β catenina en la S675 inhibe su ubiquitinación y aumenta el reclutamiento de CBP (Hino, 2005; Taurin, 2006) y la fosforilación en la S552 aumenta su importación al núcleo al interactuar con la proteína 14-3-3 ζ y su actividad transcripcional (Tian, 2004; Fang, 2007). La fosforilación de β catenina en las S552, cada vez esta cobrando más importancia en tumores con activación de la vía PI3K/Akt, sobre todo en tumores intestinales (Kobiela, 2007; Lee, 2010; Guturi, 2012).

7-. Vía Wnt/ β catenina en tiroides y cáncer de tiroides

En las células tiroideas, β catenina se localiza en las uniones adherentes. Estas células expresan varios receptores Fzd, proteínas Dvl, factores Wnt y contienen un complejo de destrucción de β catenina funcional (Helmbrecht, 2001). En pacientes con trastornos bipolares, el tratamiento con LiCl (inhibidor de GSK3 β e activador de la vía Wnt) induce la formación de nódulos en el tiroides e incluso bocio (Schou, 1968). Además en cultivos celulares de tiroides humanos y de rata, el

tratamiento con LiCl o la interferencia de GSK3 β aumentan la proliferación de estas células (Tasevski, 2000; Chen, 2010). También se ha descrito que la TSH induce el crecimiento de los tirocitos a través de la expresión de Wnt1 (Kim, 2007). Estos datos sugieren la existencia de una vía Wnt/ β catenina funcional en tiroides, relevante para la proliferación de las células de la que no se conocen en detalle los mecanismos implicados. Dado el hipotético papel de esta vía en proliferación, no es de extrañar que la activación aberrante de la vía Wnt promueva el crecimiento tumoral como ocurre en otros tejidos dependientes de la vía Wnt, como son el intestino y la piel.

En cáncer de tiroides se han descrito mutaciones de β catenina y Axina en CPDT y CAT. Las mutaciones en β catenina afectan a los residuos comprendidos entre los aminoácidos 17 y 60 (Garcia-Rostan, 1999; Garcia-Rostan, 2001), que incluyen los sitios de fosforilación de GSK3 β y CK1, lo que hace que β catenina no se pueda fosforilar por estas quinasas y no sea señalizada a degradación proteosomal. Por este motivo se acumula en citoplasma y núcleo, activando de forma aberrante la expresión de sus genes diana (ciclinaD1 y c-myc) e induciendo la proliferación.

Por otro lado, las mutaciones en el gen de la Axina1 afectan a los dominios de interacción con APC, β catenina y Dvl (Kurihara, 2004). Al ser el componente limitante del complejo de degradación, éste no se forma correctamente y β catenina queda estabilizada en citoplasma y núcleo.

Con respecto a los carcinomas diferenciados, en un 25-80% de los CFT y 67-100% de los CPT la β catenina se localiza en el citoplasma (Garcia-Rostan, 2001) y esta localización se ha relacionado con la expresión de sus genes diana ciclinaD1 y c-myc y con un mayor índice proliferativo (Ishigaki, 2002; Meirmanov, 2003; Rezk, 2004; Zhang, 2011).

Se ha descrito que β catenina está implicada en el crecimiento de células tumorales tiroideas que portan el reordenamiento RET/PTC (Cassinelli, 2009; Castellone, 2009; Tartari, 2011). La activación del receptor RET, promueve la estabilización de β catenina mediante su fosforilación en la Y654 y la inhibición de GSK3 β . De esta manera β catenina se acumula en el núcleo y activa la expresión de ciclinaD1 (Castellone, 2009).

Pero los reordenamientos cromosómicos RET-PTC solo se encuentran en un 20% de los carcinomas de tiroideos. En este sentido también se ha descrito una correlación entre mutaciones en Ras y la presencia de β catenina en el citoplasma y núcleo de células de tumores diferenciados e indiferenciados respectivamente, en los que no se han detectado mutaciones de β catenina (Garcia-Rostan, 2001). Pero no se conocen los mecanismos implicados en esta regulación ni si tiene un papel relevante en la carcinogénesis mediada por este oncogén.

Estos datos apuntan a que la vía Wnt/ β catenina podría ser activada por eventos distintos a mutaciones como son modificaciones post-traduccionales de β catenina, contribuyendo a la progresión tumoral de los carcinomas de tiroides diferenciados.

OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo se dividen en dos que a su vez los dividimos en una serie de subobjetivos.

1-. Análisis de la función de la vía Wnt/ β catenina en las células foliculares tiroideas diferenciadas

- Determinación de la expresión de los componentes de las vías Wnt en células tiroideas.
- Análisis de la regulación por TSH e IGF1 de la expresión, localización subcelular y actividad transcripcional de la β catenina en células tiroideas.
- Análisis de la regulación por TSH/cAMP de la β catenina en cultivos primarios de tirocitos.
- Determinación de la expresión de la β catenina en el tiroides de ratones hipo e hipertiroideos.
- Estudio del papel de la β catenina en la proliferación de las células tiroideas.
- Estudio del papel de la β catenina en la diferenciación de las células tiroideas.
 - Análisis de la regulación de la expresión de Pax8.
 - Análisis de la regulación de la actividad de Pax8.

2-. Análisis de la función de la vía Wnt/ β catenina en cáncer de tiroides

- Determinación de la actividad de la vía Wnt/ β catenina en respuesta a los oncogenes HRAS y BRAF.
- Análisis de la actividad de la vía Wnt en células tumorales tiroideas humanas.
- Análisis de la función de la vía PI3K/Akt en la regulación de β catenina
- Estudio de la implicación de β catenina en la proliferación de las células tumorales tiroideas.
- Análisis de la función de la β catenina en la transición epitelio mesénquima.
- Determinación de la implicación de β catenina en el crecimiento tumoral de las células tiroideas.

Materiales y métodos



1-. Materiales

1.1-. Anticuerpos

PRIMARIOS	Casa	Referencia	Dilución WB	Dilución IF/ICQ
β-actina	Santa Cruz	1616R	1/1000	
AKT1/2 (H-136)	Santa Cruz	8312	1/1000	
pAKT1/2 ser473	Santa Cruz	7985	1/1000	
βcatenina (E-5)	Santa Cruz	7963	1/1000	1/500
βcatenina (C-18)	Santa Cruz	1496	1/1000	1/500
βcatenina	Cell Signaling	9587	1/1000	1/500
pβcatenina Ser33/37/Thr41	Cell Signaling	9561	1/1000	
pβcatenina Ser675	Cell Signaling	9567	1/1000	
pβcatenina Ser 552	Cell Signaling	9566	1/1000	
p-AKT1/2 Ser473	Santa Cruz	7985	1/1000	
CTCF	Cell Signaling	2899	1/1000	
pCREB Ser133	Calbiochem	238466	1/1000	
Ciclina D1 M-20	Santa Cruz	718	1/500	
CREB	Millipore	06-863	1/1000	
ERK2	Santa Cruz	154	1/1000	
pERK (E-4)	Santa cruz	7383	1/1000	
E-cadherina	BD Transduction Labs	610182	1/1000	1/200
Anti-Flag M2	Sigma	F3165	1/500	
GSK3β	BD		1/1000	
pGSK3β	Cell signaling	9336	1/1000	
rNIS		a-r139p	1/5000	
p27 (M-197)	Santa Cruz	776	1/1000	
pan-14-3-3 (K19)g	Santa Cruz	629-g	1/1000	
p-p90RSK	Cell Signaling	9344	1/1000	
Pax8	Biopat	PA0300	1/2000	1/500
Pan-Cadherina CH-19	Sigma	C1821	1/1000	
p-p70S6K	Cell Signaling	9205	1/500	
TBP (SI-1)	Santa Cruz	273	1/500	
αTubulin (B-7)	Santa Cruz	5286	1/1000	
TPO (MoAb47)	Santa Cruz	58432	1/500	
Nkx2-1 (TTF-1)	Biopat	PA 0100	1/1000	1/1000
FoxE1 (TTF-2)	Biopat	PA 0200	1/1000	
Tiroglobulina	Dako	A0251	1/3000	
SECUNDARIOS				
Goat anti rabbit IgG-HPR	Santa Cruz	2004	1/3000	
Anti rabbit para IP	Jackson Labs	211-032-171	1/10000	
Goat anti mouse IgG-HPR	Santa Cruz	2005	1/3000	
Anti rabbit acoplado a Alexa 488	Molecular probes	A11034		1/500
Anti rabbit acoplado a Alexa546	Molecular probes	A11035		1/500
Anti mouse acoplado a Alexa 488	Molecular probes	A11029		1/500
Anti mouse acoplado a Alexa 546	Molecular probes	A11030		1/500

Tabla 1: Lista de anticuerpos utilizados para Western Blot, Inmunofluorescencia e Inmunocitoquímica.

1.2-. Plásmidos

Super8x TopFlash (M-50) y Super8x FopFlash (M-51): Vector que contiene el gen testigo de la luciferasa (pTA-Luc) fusionado al promotor artificial Top que contiene 8 sitios de unión funcionales de TCF o Fop que contiene esos 8 sitios mutados. Cedido por el Dr. RT. Moon (The Howard Hughes Medical Institute, Seattle)(Veeman, 2003).

rNUE2.8-NIS: Vector que contiene el gen testigo de la luciferasa (pBSLuc2), fusionado a un fragmento de 2854 pb del promotor de NIS de rata, conteniendo el NUE (NIS upstream enhancer) y el promotor de dicho gen. Este vector fue clonado en nuestro laboratorio (Garcia, 2002).

hTPOprom-Luc: Vector que contiene el gen testigo de la luciferasa (pGL3basic), fusionado a un fragmento de 415 pb del promotor humano de TPO. Cedido por el Dr. S Refetoff, University of Chicago, Chicago (Grasberger, 2005).

hTGenh/prom-Luc: Vector que contiene el gen testigo de la luciferasa (pGL3basic), fusionado a un fragmento de 2000pb del promotor humano de TG (Pohlenz, 2002). Cedido por el Dr. S Refetoff, University of Chicago, Chicago.

Cp5-Luc: Vector que contiene el gen testigo de la luciferasa (pGL3basic), fusionado al promotor artificial Cp5, que contiene 5 sitios funcionales de unión de Pax2/5/8. Cedido por la Dra. M. Zannini. (Institute of Experimental Endocrinology and Oncology "G. Salvatore", Napoles) (Baratta, 2009).

pRL-CMV: Vector que contiene el gen testigo de la luciferasa renilla, fusionado al promotor de expresión constitutiva de citomegalovirus (CMV), Promega.

β catenina-wt/S33Y: cDNA de la proteína wild type β catenina humana, o su versión mutada en el residuo Serina 33, clonadas en el vector expresión pCI-neo. Cedita por el Dr. B. Vogelstein (The Johns Hopkins Oncology Center, Baltimore) (Morin, 1997).

hPax8wt: cDNA del factor de transcripción Pax8 humano, clonado en el vector de expresión pcDNA3. Cedido por el Dr. G. Vassart (Institut de Recherche Interdisciplinaire en Biologie Humaine et Nucleaire, Belgium) (Vilain, 2001).

rNkx2-1wt: cDNA del factor de transcripción Nkx2-1 de rata, clonado en el vector pBluescriptII(KS-). Cedido por el Dr. R. Di Lauro (Stazione Zoologica A. Dohr, Napoles) y se describe en la siguiente referencia (Guazzi, 1990).

CREB: cDNA del factor de transcripción CREB de humano clonado en el vector pGal4 (Mendez-Pertuz, 2003).

rPax8prom-Luc: : Para llevar acabo el clonaje del promotor de *Pax8* de rata se diseñaron varias parejas de oligonucleótidos que contenían los distintos fragmentos de dicha secuencia promotora (tabla oligonucleótidos) y que se esquematizan en la figura12. En el cebador directo se añadieron las secuencias específicas de corte de las enzimas de restricción MluI y NheI y en el reverso las secuencias de corte de las enzimas de restricción BglII y XhoI. A continuación se amplificaron los

diferentes fragmentos a partir de DNA genómico obtenido de rata y se subclonaron ante el gen testigo de la luciferasa en el vector pGL3basic.

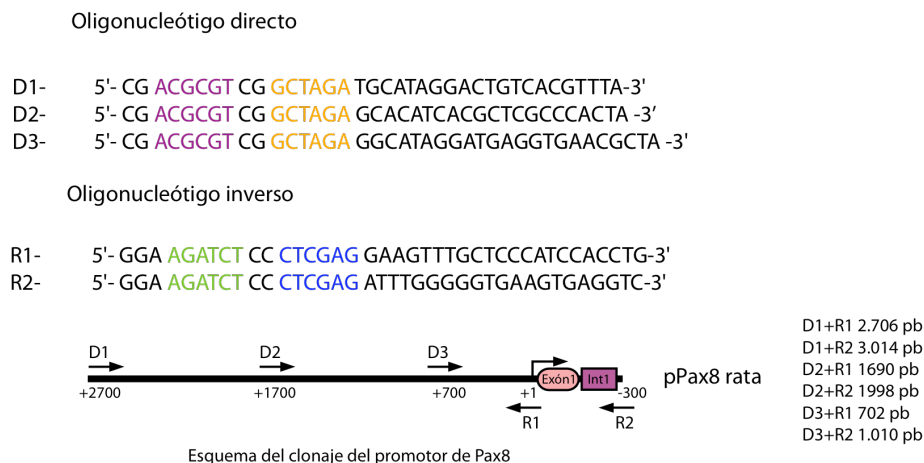


Fig.12-. Representación esquemática del clonaje del promotor de Pax8.

Vectores lentivirales:

- Vectores de empaquetamiento lentivirales **pMD2-VSVg** y **pCD-NL-BH**: Estos vectores contienen los cDNAs de las proteínas VSVg y gag, env y pol respectivamente. La expresión de estas 4 proteínas es necesaria para el correcto empaquetamiento de las partículas lentivirales.
- Vectores de expresión de los shRNA control (pGIPZ-shRNA_{mir-NS} (*non-silencing*)) y contra el mRNA de β catenina (pLKO.1 clon TRCN0000003845) (Open Biosystem).
- **E[beta]C**: Vector de expresión de la proteína β catenina^{4A}. Esta es una versión de la β catenina con las mutaciones S33A, S37A, T41A y S45A fusionada a la proteína fluorescente Cherry (mCherry)(Addgene)(Fuerer, 2010).
- **EdTP**: Vector de expresión de un dominante negativo de TCF4. Este tiene deleccionados 31 aa del extremo N terminal, región por donde interacciona con la β catenina (Addgene)(Fuerer, 2010).

1.3-. Oligonucleótidos

GEN	Oligonucleótido directo	Oligonucleótido reverso	Tamaño del amplicón	Especie
Wnt1	5'CCTCTTCGGCAAGATCGTCAAC 3'	5'TGACGTGGCAGCACCAGTGGAA 3'	734pb	Rata/humano
Wnt2	5'GTTGTATTTGCCATCACCAG 3'	5'GTCCCTGATACAGTAGTCT 3'	489pb	Rata/humano
Wnt 3	5'CTGCCGCAATTACATCGAGA 3'	5'GCCTCGTTGTTGTGCTTGTT 3'	405pb	Rata/humano
Wnt 3A	5'GCAGGAGCTACGTGGAGATCA 3'	5'GTAGTAGACCAGGTCGCGCT 3'	656pb	Rata/humano
Wnt 4	5'GCTGTACCTGGCCAAGCTGT 3'	5'GAACGGTAcTGGCACTCCTC 3'	172pb	Rata/humano
Wnt 5A	5'GTATCAGGACCACATGCAGT 3'	5'GTAGCCATAGTCGATGTTGTC 3'	316pb	Rata/humano
Wnt 7A	5'GCCTGGACGAGTGTCAAGTTT 3'	5'GTGTTACTGGCCTTGCTTCT 3'	221pb	Rata/humano
Wnt 10B	5'CACCACAGCGCCATCCTCAA 3'	5'CTTCTCTCCaAAGTCCATGTC 3'	312pb	Rata/humano
Wnt 11	5'GTGTGCTATGGCATCAAGT 3'	5'CTGTTGTGTAGACGCATCAGT 3'	522pb	Rata/humano
Left 1	5'CTACCACGACAAGGCCAGAGA 3'	5'GGCTTCACGTGCATTAGGT 3'	489pb	Rata/humano
Tcf1 (TCF7)	5'GCCTTCAATCTGCTCATGCA 3'	5'CTTGCTCTCATCTCCTTCA 3'	475pb	Rata/humano
Tcf 3 (TCF7L1)	5'CCATCTCCAAGCACACTTGT 3'	5'TCACTGCATCTCCTTCA 3'	822pb	Rata/humano
Tcf 4	5'CATGACAATCTCTCTCCACCT 3'	5'CCAAACAGCTGTGCTGCTGA 3'	647pb	Rata/humano
Dvl 1	5'GACATGTTGCTGCAGGTGAA 3'	5'CTGGAGCCACTGTTGAGGTT 3'	595pb	Rata/humano
Dvl 3	5'CAGCAGTCCACAGAACAGA 3'	5'CCAGCAGTTGGCTACAGTCA 3'	691pb	Rata/humano
βcatenina	5'CCATCTGTGCTCTTCGTCATCT 3'	5'GCAGTCTCATCCAAGCCAT 3'	527pb	Rata/humano
Fz1	5'GTGCCcTCTACCTCAACTA 3'	5'GTAGCTGAAGCGCCGATGT 3'	148pb	Rata/humano
Fz2	5'TGCACGGACATCGCCTACAA 3'	5'ACATGGAGCACAGGAAGAAG 3'	175pb	Rata/humano
Fz4	5'CAGAACGACCACAACCACAT 3'	5'CAGCATCATAGCCACACTTGA 3'	209pb	Rata/humano
Fz5	5'GAGAAGCTCATGATCCGCAT 3'	5'ACCACAGGCACATGAAGTA 3'	248pb	Rata/humano
LRP6	5'GGTTCCTTCCACATCCTT 3'	5'GGCTTGACTGGAGACATCA 3'	107 pb	Rata/humano
TLE1	5'AGCCAGCATCTTCCAGTCCAA 3'	5'AACGGTAGCCTTTTTGTCCCC 3'	160 pb	Rata/humano
TLE2	5'GCAGCATGACTTCAGTCCCAG 3'	5'ACTTGAGTGACAGCACGCAGCT 3'	103 pb	Rata/humano
TLE3	5'TGGAGGTCCTGCACCACACTAA 3'	5'GCTCACAACCACTTGCCACA 3'	115 pb	Rata/humano
TLE4	5'CCCACTGTGGCAAATGGTTT 3'	5'ACAGCTAAGCACCGATGAGGAT 3'	243pb	Rata/humano
NIS	5'TGGACTTTGACCTGATCCT 3	5'ACAAGCAGCGGCATGTACT 3'	292pb	Rata
Pax8	5'TACAGCCACACCCCGTAT 3	5'AGTGAGCGGCAATGCTGGAA 3'	271pb	Rata
c-myc	5'CCAGCAGCGACTCTGAGG 3'	5'CCAAGACGTTGTGTGTTT 3'	345pb	Rata
Ecadherina	5'AAGGGCTTGATTTCAGGCGCA 3'	5'GTGCTGTTCTTTCACAGGCTC 3'	362pb	Rata/Humano
c-myc	5'CCAGCAGCGACTCTGAGG 3'	5'CCAAGACGTTGTGTGTTT 3'	345pb	Humano
Twist1	5'CCGGAGACCTAGATGTCATTG 3'	5'ATGCAGAGGTGTGAGGATGG 3'	234pb	Humano
Snail1	5'CACTATGCCGCGCTCTTTC 3'	5'GGTCGTAGGGCTGCTGGAA 3'	113pb	Humano
Slug	5'GCTCCTCTGTTCAAGAA 3'	5'GGATCTCTGTTGTGGTATGA 3'	135pb	Humano
Fibronectina	5'CCCTTACAGTTCAGGGTTCC 3'	5'TTCAAGCCTTCGTTGACAGA 3'	164pb	Humano
Vimentina	5'GACAATGCGTCTCTGGCACGT 3'	5'TCTTCTGCCTCCTGCAGGTTCTT 3'	236pb	Humano
N-cadherina	5'TGCCATGACGTTTATGGTG 3'	5'TGGTTGACCACGGTGACTA 3'	199pb	Humano
Zeb1	5'GCTGACCAGAACAGTGTT 3'	5'CAGAGTCATTCTGATCCTC 3'	211pb	Humano
Actina	5'CACTCTCCAGCCTTCCTT3'	5'CTCGTCATACTCTGCTTGCT 3'	314pb	Rata/Humano

Primers Clonaje

Sitios de restricción

D1 Promotor Pax8	CG ACGCGT CG GCTAGA TGCATAGGACTGTCACGTTTA	Mlu NheI
D2 Promotor Pax8	CG ACGCGT CG GCTAGA GCATACACGCTCGCCCACTA	Mlu NheI
D3 Promotor Pax8	CG ACGCGT CG GCTAGA GGCATAGGATGAGGTGAACGCTA	Mlu NheI
R1 Promotor Pax8	GGA AGATCT CC CTCGAG GAAGTTTGCTCCCATCCACCTG	BglII XhoI
R2 Promotor Pax8	GGA AGATCT CC CTCGAG ATTTGGGGGTGAAGTGAGGTC	BglII XhoI

Tabla 2-. Lista de oligonucleótidos utilizados para PCR, QPCR y clonaje del promotor de Pax8.

1.4-. Líneas celulares

FRTL5 y PCCI3: Líneas celulares epiteliales tiroideas de rata, obtenidas a partir de cultivos primarios de tiroides de ratas Fischer de 6 semanas (FRTL5) o 18 meses (PCCI3) (Ambesi-Impiombato, 1980; Fusco, 1987). El crecimiento de estas líneas es dependiente de TSH e IGF1. Ambas líneas expresan los marcadores de diferenciación tiroideos (Tg, TPO, NIS y TSHR) así como los factores de transcripción específicos del tiroides (Pax8, Nkx2-1 y FoxE1), por lo que son un buen modelo para estudiar los procesos de proliferación y diferenciación tiroideos.

Líneas tumorales humanas: Todas las líneas utilizadas en este estudio, fueron obtenidas a partir de cultivos primarios de tumores de tiroides de pacientes que desarrollaron CFT, CPT o CAT. Su origen y mutaciones descritas se resumen en la tabla 3.

LÍNEA CELULAR	Tipo cancer	Origen	Medio	Referencia
BCPAP	CPT	Massimo Santoro	DMEM	Fabien 1994
KTC-1	CPT	Junichi Kurebayashi	RPMI	Sato 2000
TPC1	CPT		DMEM	Ishizaka 1989
FTC-133	CFT	ECACC	DMEM	Rao 2005
WRO	CFT		RPMI	Estour 1989
T238	CAT	Lucia Roque	RPMI	Chung 2002
FRO	CAT		RPMI	Nishihara 1997
KTC-2	CAT	Junichi Kurebayashi,	RPMI	Kurebayashi 2003
CAL62	CAT	DSMZ	DMEM	Gioanni 1991
8505c	CAT	DSMZ	RPMI	Iti 1993
SW1736	CAT	Dr. Erik Heldin	DMEM	Xu 2003
Hth7	CAT	Dr. Erik Heldin	MEM	Heldin 1991
Hth74	CAT	Dr. Erik Heldin	MEM	Heldin 1991
Hth83	CAT	Dr. Erik Heldin	MEM	Heldin 1991
C643	CAT	Dr. Erik Heldin	MEM	Heldin 1991
Nthy-ori-3-1	Tiroidea no tumoral	ECACC	RPMI	Lemoine 1989
HeLa	Carcinoma cervix	ECACC	DMEM	
HEK293T	Riñón no tumoral	ECACC	DMEM	

Tabla 3-. Líneas tumorales humanas. CPT: Carcinoma Papilar de tiroides; CFT: Carcinoma Folicular de tiroides; CAT: Carcinoma Anaplásico de tiroides.

Células PC-BRAF y PC-HRAS. Células PCCI3 transfectadas de forma estable con los vectores de expresión de los oncogenes HRAS^{Val12} (Shirokawa, 2000) y BRAF^{V600E} (Mitsutake, 2005) inducibles por doxiciclina.

1.5-. Ratones

Para llevar a cabo los experimentos de este trabajo se emplearon ratones FVB/C57, ratones CD1 y ratones inmunodeprimidos NOD-SCID, todos ellos generados en el animalario del IIBm.

Los ratones utilizados se mantuvieron en un ambiente estéril, mediante rayos U.V., con viruta, agua y comida administrada *ad libitum*. Cuando se detectó cualquier signo importante de enfermedad, los ratones fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂. Todos los procedimientos se han realizado según la normativa española del uso de animales de experimentación (Real Decreto 1201/2005, del 10 de octubre).

2-. Métodos

2.1-. Cultivos celulares

Las células PCCI3 y FRTL5 se crecieron en medio COON's Ham's F12 modificado, suplementado con un 5% de suero DONOR y con una mezcla de 6 hormonas que consiste en: somatostatina 10mg/ml, transferrina 5µg/ml, hidrocortisona 10nM, glicil-L-histidil-L-lisina 10ng/ml, TSH 1nm e insulina 10µg/ml (Sigma). A lo largo de este trabajo, nos referiremos a este medio como medio completo o 6H.

Para determinar el efecto de los distintos estímulos sobre las líneas PCCI3 y FRTL5, estas se mantuvieron en el medio anterior, pero en ausencia de TSH e insulina y con una concentración mínima de suero (0,2%), durante 48 horas. A partir de ahora denominaremos a este medio, medio basal (-) o 4H. En este estado las células se encuentran en un estado de quiescencia y no expresan los factores de diferenciación tiroideos.

Tras 48 horas en medio 4H, las células se estimularon con los compuestos y concentraciones indicados en la tabla 4 y como se describirá en la correspondiente sección de resultados. Se preincubó con los inhibidores una hora, y el tiempo de incubación con los estímulos varió según el ensayo.

REACTIVO	Concentración	Diana	Casa comercial
TSH	0,5 mU/ml	Activación PKA/PI3K	Sigma
IGF1	100ng/ul	Activación PI3K	Peptrotech
Forskolina	10mM	Activación AC	Sigma
H89	10mM	Inhibidor PKA	Calbiochem
Akt-i-VIII	10mM	Inhibidor AKT	Sigma
LY	10mM	Inhibidor PI3K	Sigma
Wormanina	50mM	Inhibidor PI3K	Calbiochem
Rapamicina	100nM	Inhibidor mTOR	LC Labs
UO126	10mM	Inhibidor MEK	Calbiochem
LiCl	20mM	Inhibidor GSK3	Sigma
Wnt3A	50ng/ml	Activador vía Wnt	Millipore

Tabla 4-. Reactivos y concentraciones utilizadas.

Las células PC-BRAF y PC-HRAS se cultivaron en medio de selección (medio 6H suplementado con 300mg/ml de geneticina y 120µg/ml de higromicina). Para realizar los ensayos, se cultivaron en medio 4H durante 48 horas y posteriormente se les añadió 1µg/ml de doxiciclina para estimular la expresión de los oncogenes BRAF y HRAS. El tiempo de estimulación se indica en cada caso.

Las líneas tumorales humanas se cultivaron en el medio indicado en la tabla 3, suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS).

2.2-. Obtención de cultivos primarios de tiroides de ratón

Los tirocitos de ratón fueron obtenidos a partir de la disección de los lóbulos tiroideos de ratones de 2 meses (Jeker, 1999). Posteriormente se trocearon y se digirieron en un tampón compuesto por colagenasa tipo I (Sigma: 112U/ml) y dispasa II (Sigma: 1,2U/ml) durante 45 minutos a 37°C y en agitación (1000rpm). A continuación se tripsinizaron durante 5 minutos a 37°C y se cultivaron en medio 6H. Se confirmó la identidad de estas células analizando la expresión de los factores de transcripción tiroideos mediante Western blot.

2.3-. Métodos de detección de RNA

2.3.1-. Extracción de RNA

Cada tipo celular fue cultivado en el medio correspondiente y que se ha indicado en la sección “cultivos celulares” o en 4H con los estímulos indicados. Posteriormente las células se lavaron con PBS (Tampón fosfato pH 7) a 4°C, y el RNA se extrajo utilizando Trizol (Sigma) siguiendo las instrucciones del proveedor. La cantidad de RNA y su pureza se determinó midiendo la absorbancia a 260 y 280nm.

2.3.2-. RT-PCR

Para obtener el cDNA de cada una de las muestras, 1,5 µg de RNA fueron retro-transcriptos según el protocolo que se describe a continuación. A cada RNA se le añadieron 200ng de dNTPs, 200ng de “randon primers” en un volumen de 14 µl de agua destilada. Se desnaturalizó 10 minutos a 65°C, y se incubaron 2 minutos en hielo. Posteriormente se añadieron 200U de la retro-transcriptasa M-MLV (Promega), 40U del inhibidor de RNasa (RNaseOUT, Invitrogen), y el tampón comercial de la M-MLV en un volumen final de 20µl y se realizaron los siguientes ciclos: 10 minutos 25°C, 15 minutos 37°C, 15 minutos 40°C, 30 minutos a 42°C y 5 minutos a 95°C. El cDNA se diluyó 5 veces en agua destilada y se utilizó 1µl (150ng) por reacción de PCR o Q-PCR.

Los oligonucleótidos utilizados se resumen en la tabla 2. Todos ellos se diseñaron en exones distintos para amplificar únicamente el mRNA procesado y evitar la amplificación de DNA genómico

y se testaron mediante PCR convencional para asegurar su especificidad (Go Taq Flexi DNA pol, Promega).

2.3.3 PCR cuantitativa (Q-PCR)

Las PCRs cuantitativas se llevaron a cabo utilizando la mezcla de reacción de SYBR green: KAPA SYBR FAST 2x con Rox y el aparato de PCR: Mx3000P QPCR system (Agilent). Cada reacción se realizó por triplicado, utilizando 150ng de cDNA en cada punto. Los parámetros utilizados para la amplificación fueron los siguientes: 5min 95°C, 40 ciclos: 20seg 95 °C; 20seg 58-62 °C; 30seg 72 °C, 10min 72 °C. La especificidad de cada par de oligonucleótidos en cada reacción se determinó realizando la curva de disociación. Se utilizó el software de "*Stratagene analysis*" para sustraer la fluorescencia basal. La expresión relativa de cada gen se calculó utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Giulietti, 2001). Se representan los niveles de expresión de cada producto de PCR con respecto a la β -actina.

2.4-. Métodos de detección de proteínas

2.4.1-. Extracción de proteínas totales, nucleares y citoplasmáticas

Cada tipo celular se cultivó como se describe en el apartado de métodos y se estimuló como se indica en cada caso. Las células se lavaron con PBS frío y se lisaron en tampón RIPA (PBS, 1%NP-40 1%, 1% SDS, 0,5% deoxicolato sódico) suplementado con un cocktail de inhibidores de proteasas. Posteriormente se centrifugaron a 12.000rpm durante 10 minutos a 4°C y se conservaron los sobrenadantes conteniendo las proteínas totales. Los extractos fraccionados (citoplasmáticos y nucleares) fueron obtenidos como se describe en (Perona, 1997). La concentración de proteína fue determinada por el método Bradford (Bradford 1976), realizando una curva standard de albúmina sérica bovina (BSA).

2.4.2-. Western-blot e inmunodetección

Extractos de proteínas totales o citoplasmáticas (30µg) y nucleares (15µg), fueron separados en geles de SDS-PAGE y transferidos a una membrana de nitrocelulosa. A continuación se bloquearon las membranas 1h a temperatura ambiente con una solución de PBS-T (PBS con Tween-20 al 0,1%) con leche desnatada al 5%. Tras la incubación O/N a 4°C o 2h a temperatura ambiente con los anticuerpos primarios en solución de bloqueo (indicados en la tabla 1), se realizaron 3 lavados de 10min con PBS-T, seguidos de una incubación de 1h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa. Tras dos lavados con PBS-T y uno con PBS, las bandas inmunoreactivas fueron visualizadas mediante radiografía utilizando el agente de detección de Western-blot Luminol (Thermo Fisher).

Se muestra un ensayo de Western-blot representativo de al menos 3 experimentos independientes. En algunos ensayos se utilizó el programa ImageJ para cuantificar densitométricamente los niveles de proteína. En estos casos, la gráfica que acompaña al ensayo de WB representándose como la media y el error estándar.

2.4.3-. Inmunoprecipitación

Para llevar a cabo los ensayos de inmunoprecipitación se incubaron extractos nucleares de células PCCl3 con bolas magnéticas unidas a proteína A, previamente conjugadas con el anticuerpo de Pax8 o una IgG de conejo. Para ello se bloquearon las bolas magnéticas (Dynabeads, Invitrogen) en tampón de bloqueo (PBS con un 1% de BSA) durante 30min a 4° C en rotación, utilizando 10µl de bolas magnéticas por condición. A continuación se incubó con 1µg de anti-Pax8 o IgG de conejo durante 1h en rotación y se eliminó el exceso de anticuerpo lavando las bolas dos veces con tampón A pH8 (10mM KCl, 150mM EGTA, 150mM EDTA, 10mM NaCl, 0,1% NP-40) y con inhibidores de proteasas. Posteriormente se añadieron 200µg de extractos nucleares de PCCl3 en tampón A con inhibidores de proteasas y se incubaron en rotación O/N a 4° C. Se recuperó la proteína no unida a las bolas (fracción no inmunoprecipitada) y tras lavar las bolas 3 veces, se eluyó la proteína inmunoprecipitada añadiendo tampón Laemli 2x y calentando las muestras 10 minutos a 95°C. Los inmunocomplejos se analizaron mediante SDS-page e inmunodetección. La fracción no inmunoprecipitada se utilizó para determinar la eficiencia del anticuerpo de Pax8.

2.4.3-. Inmunofluorescencia e inmunohistoquímica de células y tejidos

Para realizar las **inmunofluorescencias**, las células sembradas sobre cubreobjetos o cortes de tejidos conservados en OCT fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 10 min. Después de tres lavados con PBS, las células/tejido fueron permeabilizados con PBS/0,1% TritónX-100 durante 15min e incubados en solución de bloqueo (PBS, 1% BSA) durante 1h a temperatura ambiente. A continuación se incubaron O/N a 4° C con el anticuerpo primario (utilizando las concentraciones indicadas en la tabla 1) en solución de bloqueo y en cámara húmeda. Tras otros tres lavados con PBS se incubó 1h con el anticuerpo secundario conjugado con Alexa fluor 488 o 546 en solución de bloqueo. Finalmente los cubreobjetos se lavaron 2 veces con PBS y una vez con H2O destilada y se colocaron sobre portas utilizando “antifade” como líquido de montaje (Prolong Gold Invitrogen) conteniendo 4-,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para la tinción nuclear.

Las células fueron visualizadas al microscopio de fluorescencia utilizando objetivos de 60x o 100x con aceite de inmersión. Las imágenes fueron tomadas utilizando un microscopio confocal Spectra Leica TCS SP5 y un obtetivo de 63x.

Para realizar las **inmunocitoquímicas**, se utilizó el kit Vectastain ABC (Vector Labs). Tras lavar el anticuerpo primario, los portas con las células se incubaron con un anticuerpo secundario

conjugado con biotina durante una hora y se reveló con una solución de Diaminobencidina-Niquel siguiendo las instrucciones del proveedor. Para el montaje de los cubres, estos se deshidrataron gradualmente, incubándolos en etanol al 70%, 96%, 100% y finalmente en xilol, y se montaron sobre portas utilizando DPX. Las células fueron visualizadas utilizando un microscopio de campo claro (Nikon 90i).

Para realizar las **inmunohistoquímicas** a partir de cortes en parafina, se utilizó el kit EnVision+ System-HRP (DAB)(Dako). Las muestras fueron desparafinadas, rehidratadas y se desenmascararon los antígenos incubándolas en tampón citrato (0,01M pH 6). Se inhibió la actividad peroxidasa endógena incubando las muestras con peróxido de hidrógeno al 3% y a continuación se incubó el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo (PBS1x, BSA1%) durante 1h. Tras lavar las muestras se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con HRP durante una hora y se reveló con una solución de Diaminobencidina y siguiendo las instrucciones del proveedor. Posteriormente las muestras fueron contra teñidas con Hematoxilina, deshidratadas y montadas con DPX. Las células fueron visualizadas utilizando un microscopio de campo claro (Nikon 90i).

2.5-. Generación de líneas celulares mediante el uso de lentivirus

Produjimos los siguientes lentivirus de segunda generación, para obtener células con la vía Wnt modificada:

- **pGIPZ shscramble:** lentivirus control que contiene el gen de resistencia a la puomicina.
- **pLKO.1 sh β cat:** lentivirus que expresan un shRNA contra β catenina junto con el gen de resistencia a la puomicina.
- **E[beta]C:** Lentivirus que expresan una β catenina constitutivamente activada junto con el gen de la proteína fluorescente Cherry.
- **EdTP:** lentivirus que expresa un dominante negativo de TCF4 marcado con el péptido Flag junto con el gen de resistencia a la puomicina.

Para la producción de cada lentivirus, se sembraron 1×10^6 células Hek293T en p100 y como se describe en el apartado de transfecciones, se co-transfectaron con 10 μ g del plásmido lentiviral correspondiente junto con 5 μ g de cada uno de los vectores empaquetadores (pMD2-VSVg y pCD/NL-BH). Tras 16 horas se lavaron las células con medio DMEM completo y se añadieron 5 ml del medio de producción de virus (Medio Ultraculture 12-725F, suplementado con 1% glutamina, 100mM piruvato sódico, 1% de bicarbonato sódico (7,5%) y 5mM de butirato sódico). A las 48 horas de la transfección, se recogió el sobrenadante que contenía las partículas virales y se pasaron por un filtro de 45 μ m. En este paso las partículas virales se pueden conservar a -80°C.

Para llevar a cabo la **infección**, se sembraron 2×10^5 células en placas de 6 pocillos y 24 horas después se les añadió una dilución 1/2 o 1/5 del sobrenadante del lentivirus correspondiente,

conteniendo 8µg/ml de polibreno en un volumen de 3ml. Se incubaron los lentivirus con las células durante 30min, se centrifugaron a 1.100xg durante otros 30min y se reemplazó el medio por medio fresco. A las 48h las células infectadas con los lentivirus pGIPZ-shcramble, pLKO.1-shβcat y EdTP, se seleccionaron con puromicina 1µg/ml durante 48 horas y las células resistentes se ensayaron para la expresión de βcatenina o del Flag-dnTCF4 por WB, utilizando como control las células infectadas con el lentivirus scramble.

En el caso de las células infectadas con el lentivirus E[beta]C, dado que expresan la proteína roja Cherry, se seleccionaron por citometría de flujo y se detectó por WB la expresión de βcatenina.

2.6-. Transfecciones transitorias

Se sembraron 350.000 (PCCl3/FRTL5) o 200.000 células (líneas humanas) en placas de 6 pocillos, y 100.000 o 75.000 células respectivamente en placas de 12 pocillos. Tras 24 horas se añadió el medio completo correspondiente con HEPES 10mM a pH 7,35 y se procedió a transfectar.

Las células Hela y Hek293T se transfectaron por coprecipitación con fosfato de calcio (Chen, 1988), mientras que las células tumorales humanas, las PCCl3 y las FRTL5 fueron transfectadas con el agente JetPEI (Polyplus) siguiendo las instrucciones del producto.

En los análisis de actividad de los promotores Top, Fop, Pax8, NIS y Cp5, las células fueron co-transfectadas con 0,32-1,2 µg del vector de expresión de luciferasa correspondiente, junto con 25-50ng del vector de expresión de renilla bajo el control del promotor de CMV, para controlar la eficiencia de transfección. Las co-transfecciones con otros vectores de expresión se indican en cada experimento y se mantuvo constante la cantidad de DNA de cada transfección añadiendo la cantidad apropiada de un vector de expresión vacío (pcDNA3.1).

Después de 24 horas las células PCCl3 se cultivaron durante 48h en medio 4H y fueron tratadas 24h con los estímulos indicados. A las células Hela, Hek293T y las distintas líneas tumorales humanas se les reemplazó el medio y se cultivaron durante otras 24 horas en medio completo. A continuación se lavaron con PBS y se recogieron en buffer de lisis pasiva para el análisis de la actividad luciferasa y renilla (Promega). La actividad del promotor se determinó como la relación entre la actividad luciferasa y la actividad renilla. En el caso de los promotores Top y Fop, además se calculó la relación Top/Fop, para substrair la actividad del promotor basal de timidina quinasa.

La expresión de los vectores transfectados se determinó mediante WB. Los resultados muestran la media y desviación estándar de un ensayo realizado por triplicado, representativo de al menos tres experimentos.

2.7-. Ensayo de incorporación de BrdU

Como medida de la proliferación celular, se cuantificó la incorporación de BrdU realizada durante la síntesis de DNA utilizando el ensayo: "Cell Proliferation ELISA BrdU Assay" y siguiendo las instrucciones del proveedor. Se sembraron 5×10^3 células por pocillo de placa de 96 (6005225 Perkin Elmer). En el caso de las PCCl3 se incubaron con nocodazol ($0,4 \mu\text{g/ml}$) durante 16 horas, para sincronizar las células en fase G2. A continuación, se cambio el medio a medio mínimo (4H) con los tratamientos indicados en cada ensayo y se incubaron las células durante 24h con el correspondiente estímulo. En el caso de las células tumorales humanas, se sembraron en medio completo y se mantuvieron así durante 24h. Después se añadió el BrdU a una concentración final de $10 \mu\text{M}$ y se incubó durante 2h, tras las cuales se cuantificó la cantidad de BrdU incorporado mediante un ensayo de ELISA. Los resultados muestran la media \pm S.D. de un ensayo realizado por octuplicado, representativo de al menos tres experimentos.

2.8-. Medida del crecimiento celular

Como medida del crecimiento celular, se cuantificó el número de células utilizando la tinción con cristal violeta. Para ello se sembraron 20.000 células por pocillo de multi-well de 24 en medio completo y fueron fijadas a los tiempos indicados con 1% de glutaraldehído. Tras ser lavadas con PBS, se tiñeron con 0,1% del colorante cristal violeta. El colorante asociado a las células se desprendió con una solución de ácido acético al 10%. El número de células se estimó leyendo la absorbancia a 595 nm. Las gráficas muestran el % de células con respecto al tiempo 0, representándose la media \pm S.D. de un ensayo ($n=3$), representativo de al menos tres experimentos.

2.9-. Ensayo de detección de senescencia

Como medida de senescencia, se cuantificó la expresión de la β -Galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -Gal). Las células FTC133, Hth83, Hth7 Hth74 y C643 infectadas y seleccionadas se sembraron en placas de 12 pocillos (70.000 células/pocillo), a las 24 horas se fijaron y tiñeron para SA β -Gal utilizando el kit Senescence Detection Kit (BioVision) y siguiendo las instrucciones del proveedor. Para hallar el porcentaje de células SA β -gal positivas se contó el número de células positivas en cuatro campos usando un objetivo de 10x. Los resultados muestran la media y error estándar de tres ensayos realizados por duplicado.

2.10-. Generación de ratones Hipertiroides (T4/T3) e Hipotiroides (MMI)

Ratones CD1 machos de dos meses fueron divididos en tres grupos: 1) Grupo control; 2) Grupo Metimazol (MMI), que fue tratado con 0,03% de MMI (Sigma) en agua de bebida durante 15 días; 3) Grupo T3/T4, que fue tratado con 0,5µg/ml de T3 y 0,1µg/ml de T4 en el agua de bebida durante 15 días. tres horas antes del sacrificio se les inyectó 60mg/kg de BrdU. Se recogieron las muestras de tiroides y riñón. La mitad se fijaron en folmaldehído al 4% y se procesaron para realizar bloques de Parafina, y la otra mitad se criopreservó en OCT. La morfología de la glándula se visualizó por tinción de H&E.

2.11-. Ensayos de tumorogénesis *in vivo*

Ratones NOD-SCID de dos meses fueron inyectados en los dos flancos traseros con 9×10^5 células FTC133 infectadas con los lentivirus shscramble o sh β cat descritos en el apartado de “Generación de líneas celulares”. El volumen de los tumores fue medido dos veces a la semana desde su aparición visible (volumen inicial 0,2 mm³) calculándose según la ecuación $V = \text{Pi} \times \text{largo} \times \text{ancho} / 6$. Cuando el volumen del tumor en el flanco del ratón alcanzó 0,5 mm³ se sacrificaron y sacaron los tumores.

2.12-. Ensayo de invasividad en matrigel

Para realizar los ensayos de invasividad en matrigel se utilizó el Kit BD BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber y se siguieron las instrucciones del proveedor. Se rehidrató el matrigel añadiendo medio DMEM sin suplementar y posteriormente se sembraron 25.000 células por cámara en medio DMEM con un 0,2% de FBS, que previamente habían sido mantenidas en este medio durante 24h. En el pocillo de la placa multi-well se añadió DMEM suplementado con un 15% de FBS como agente quimiotáctico. Se incubaron las células durante 22 horas para permitir su invasividad y posteriormente se eliminaron las células contenidas en el matrigel y se fijaron y tiñeron las células que habían invadido utilizando el Kit Diff-Quik staining kit. A continuación cortaron y montaron sobre portaobjetos las membranas que contenían las células que habían invadido y se cuantificaron realizando fotos de 10 campos y contando el número de células por foto. Los resultados representan la media \pm S.D. de un ensayo realizado por duplicado.

Resultados



1-. Función de la vía Wnt/ β catenina en la proliferación y la diferenciación celular tiroidea

1.1.- Caracterización de las vías Wnt en células tiroideas diferenciadas de rata

Se ha descrito que las células tiroideas humanas expresan diversos componentes de la vía Wnt y que conservan una vía Wnt/ β catenina funcional (Helmbrecht, 2001). Por ello para iniciar este estudio en primer lugar se analizó la expresión de los distintos genes de la vía Wnt en la línea celular utilizada en este trabajo, las células PCCI3, que son células foliculares tiroideas de rata diferenciadas.

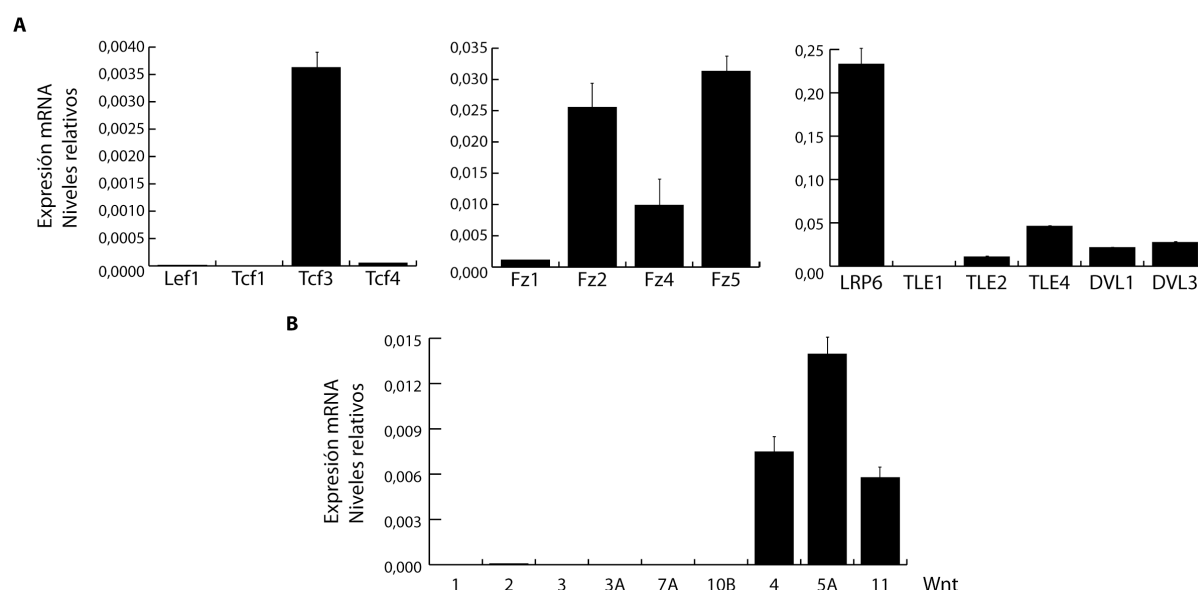


Fig.13-. Expresión de los componentes de las vías Wnt en células PCCI3. RNA fue extraído y retro-transcrito de células PCCI3 cultivadas en medio completo para la posterior detección mediante QPCR de los niveles del mRNA de los genes indicados relativos a la expresión de la β -actina. **Panel A:** Expresión de los receptores, co-receptores, mediadores intracelulares, represores y factores de transcripción de la vía Wnt. **Panel B:** Expresión relativa de los factores Wnt canónicos y no canónicos.

Mediante PCR cuantitativa determinamos que las células PCCI3 expresaban los receptores *Fz1*, *2*, *4* y *5*, el co-receptor *LRP6* y los mediadores intracelulares *Dvl1* y *3* todos ellos necesarios para la transducción de la señal de los factores Wnt (Fig.13 A). Así mismo expresaban los factores de transcripción *Tcf1*, *3* y *4*, pero no *LEF1*.

A continuación analizamos la expresión de varios de los factores Wnt tanto activadores de la vía canónica como de las vías no canónicas (Fig.13 B). Los resultados indicaron que las células PCCI3 expresaban niveles muy bajos de los factores Wnt canónicos *Wnt2*, *3*, *7A* y *10B* y que no expresaban los factores *Wnt 1* y *3A*. Por el contrario se detectaron niveles de expresión muy elevados de los factores Wnt no canónicos *Wnt 4*, *5A* y *11*.

Estos resultados indicaban que las células PCCI3 podían responder a factores Wnt ya que expresaban toda la maquinaria necesaria.

1.2.- TSH e IGF1 inducen la entrada al núcleo de β catenina y la inhibición de GSK3 β

Como acabamos de describir, las células tiroideas PCCI3 tienen la capacidad de responder a factores Wnt y sorprendentemente expresan altos niveles de factores Wnt activadores de las vías no canónicas. Dichas vías regulan procesos relacionados con la migración y polaridad celular pero no se conoce su papel en tiroides. Por el contrario la vía canónica tiene un papel muy importante en la carcinogénesis tiroidea y se ha relacionado con la proliferación de las células foliculares (Tasevski, 2000; Kim, 2007; Chen, 2010), por lo que decidimos profundizar en el estudio de su función en nuestro sistema celular.

La β catenina es el efector de la vía Wnt canónica. En células epiteliales en condiciones basales se localiza en las uniones adherentes y en respuesta a factores Wnt, se acumula en el núcleo, donde activa la expresión de sus genes diana. Así la localización nuclear de β catenina se considera uno de los distintivos de la activación de la vía Wnt.

Como se ha descrito en la introducción la TSH y el IGF1 son los principales reguladores de la proliferación de las células tiroideas a través de la activación de las vías PKA y PI3K/Akt respectivamente. Sin embargo, se ha sugerido que otras vías de señalización como la vía Wnt/ β catenina, podrían estar implicadas en la regulación de este proceso.

Con el fin de estudiar la implicación de esta vía en la proliferación de los tirocitos, en primer lugar analizamos la localización subcelular de β catenina en respuesta a TSH e IGF1. Para ello utilizamos las células tiroideas PCCI3 y FRTL5 que responden al estímulo proliferativo de ambos factores. Dichas células se cultivaron durante 48 horas en medio basal para lograr un estado de quiescencia y posteriormente se estimularon con TSH, IGF1 o ambos ligandos durante 16 horas y se determinó la localización subcelular de la β catenina mediante inmunocitoquímica.

Como se muestra en la figura 14 A, en las células PCCI3 en estado basal (-) la β catenina se localizó en las uniones adherentes, no apreciándose en la fracción citoplasmática o nuclear (Fig 14 A). La estimulación con TSH o IGF1 indujo la acumulación de la β catenina tanto en el citoplasma como en el núcleo. Es interesante destacar que la acumulación inducida por ambos fue mayor que la inducida por el Li, que se usó como activador de la vía Wnt. Los mismos resultados se obtuvieron con las células FRTL5 (datos no mostrados).

Estos resultados se confirmaron analizando por western blot la expresión de la β catenina en extractos nucleares y citoplasmáticos de células PCCI3 y FRTL5 tratadas con los estímulos anteriores. Como se muestra en la figura 14 B, la expresión de β catenina aumentó en la fracción nuclear tras la estimulación con TSH o IGF1, alcanzando de nuevo niveles mayores que los inducidos por el Li. La acumulación nuclear de β catenina fue evidente a tiempos de estimulación tan cortos como 30 minutos (Fig 14 C), como determinamos mediante inmunofluorescencias y análisis por microscopía confocal.

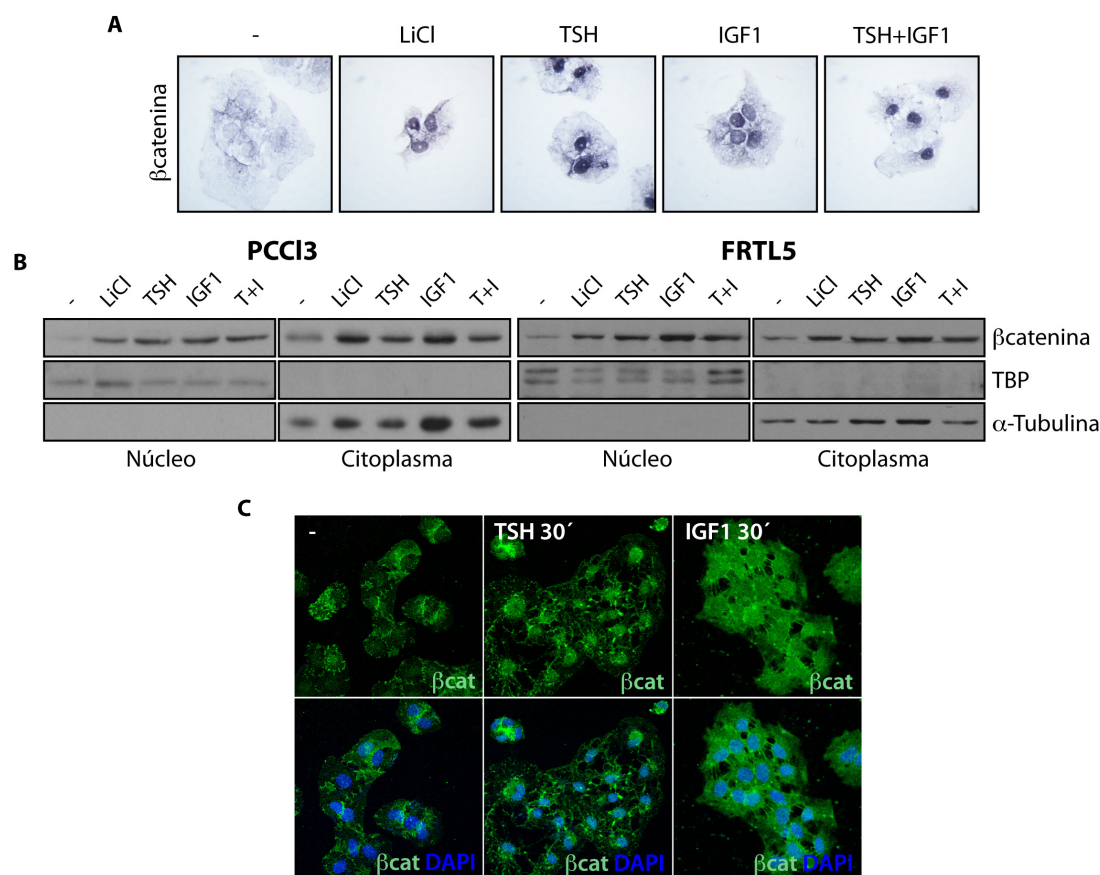


Fig.14-. Efecto de la TSH y el IGF1 sobre la localización subcelular de la βcatenina. Células PCC13 o FRTL5 sembradas en cubreobjetos (**A y C**) o en placas (**B**) fueron cultivadas en medio basal durante 48 horas y posteriormente fueron mantenidas en este medio (-) o fueron tratadas durante 16 horas (**A y B**) o 30 minutos (**C**) con TSH, IGF1, TSH+IGF1 o con LiCl como control positivo. **Panel A:** Se determinó la localización subcelular de βcatenina en células PCC13 mediante inmunocytoquímica, utilizando un microscopio de campo claro y un objetivo de 100 aumentos. Se muestran una serie de fotografías representativas de 3 experimentos independientes. **Panel B:** Se obtuvieron extractos nucleares o citoplasmático de células PCC13 y FRTL5 y se analizaron mediante Western-blot los niveles de βcatenina en cada fracción. Se detectaron los niveles de α-tubulina y TBP como control de carga de los extractos citoplasmáticos y nucleares respectivamente y para controlar la pureza de cada fracción. Se muestra un ensayo representativo de 3 experimentos independientes. **Panel C:** Se determinó la localización subcelular de βcatenina mediante inmunofluorescencia, utilizando un microscopio confocal con un objetivo de 63 aumentos. Se muestran una serie de fotografías representativas de 3 experimentos independientes en las que se observa la inmunodetección de βcatenina y su superposición con la tinción nuclear (DAPI).

El rápido efecto que ejercen la TSH y el IGF1 sobre la localización de βcatenina sugiere que ambos ligandos podrían estar regulando la localización nuclear de la βcatenina por un mecanismo que implicase un cambio postraduccionales mas que por un mecanismo transcripcional. Estos cambios postraduccionales están regulados por diferentes vías de señalización por lo que nos planteamos estudiar por que vías la TSH y el IGF1 regulaban el anterior proceso.

Como ya se ha mencionado en la introducción la GSK3β es una de las quinasas responsables de la degradación de la βcatenina ya que fosforilándola en el extremo N-terminal hace que sea reconocida por ubiquitina ligasas y degradada por el preoteasoma, manteniendo así la vía Wnt "apagada".

La actividad de la GSK3β se inhibe mediante su fosforilación en la Serina9 proceso que es llevado a cabo por varias quinasas siendo Akt la mejor descrita (Cross, 1995). Se considera a la GSK3β un inhibidor de la proliferación y del crecimiento celular que se inhibe en respuesta a factores de

crecimiento que activan la vía PI3K/Akt como son IGF1, EGF o HGF (Cross, 1995; Guturi, 2012). Además también se ha descrito que la quinasa PKA puede fosforilar e inhibir a la GSK3 β (Fang, 2000). Por ello nos planteamos estudiar si la TSH o el IGF1 podían estar ejerciendo su efecto sobre la β catenina a través de la inhibición de la GSK3 β .

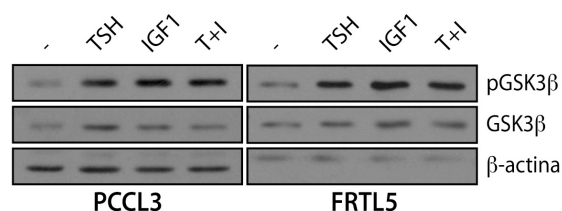


Fig.15-. Aumento de los niveles de pGSK3 β en respuesta a TSH e IGF1. Se cultivaron células PCCL3 o FRTL5 en medio basal durante 48 horas y posteriormente fueron mantenidas en este medio (-) o se trataron 30 minutos con TSH, IGF1, TSH+IGF1 o con LiCl como control positivo. Tras el tratamiento, las células fueron recolectadas para la detección, mediante Western-blot, de los niveles de pGSK3 β y de GSK3 β y β -actina como control de carga. Se muestra un ensayo representativo de 3 experimentos independientes.

Para estudiar esta posibilidad, analizamos la fosforilación de GSK3 β en células PCCL3 y FRTL5 tras 30 minutos de estimulación con TSH, IGF1 o ambos, utilizando de nuevo el Li como control positivo. Como se muestra en la figura 15 tanto la TSH como el IGF1 indujeron un aumento en la fosforilación de GSK3 β , indicando que ambos ligandos inhiben a la actividad de dicho enzima. Dado que se obtuvieron los mismos resultados en las células PCCL3 y FRTL5, a partir de ahora se mostrarán solo los resultados obtenidos en las células PCCL3.

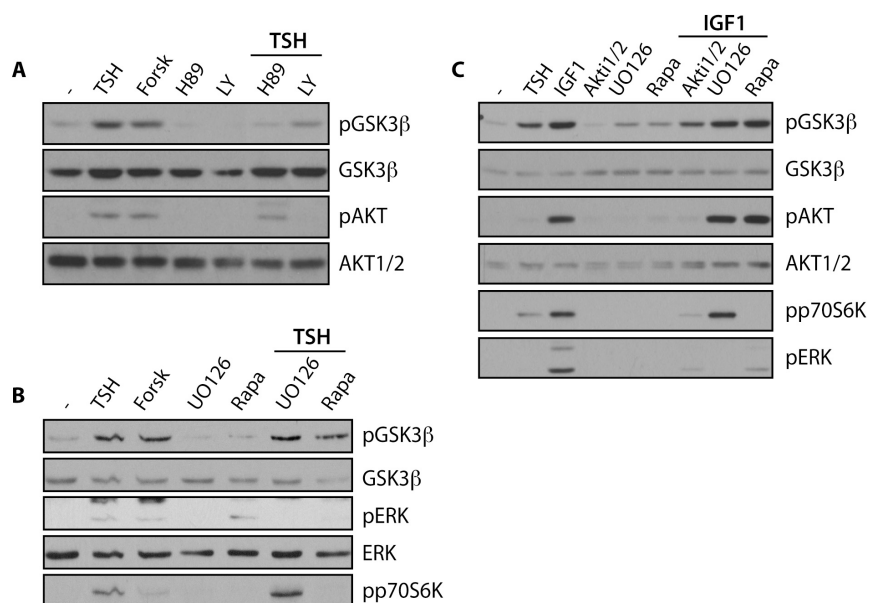


Fig.16-. Vías de señalización implicadas en la fosforilación de GSK3 β en respuesta a TSH e IGF1. Se cultivaron células PCCL3 en medio basal durante 48 horas y posteriormente fueron mantenidas en este medio (-) o se trataron con H89, LY294002 (LY), Akt1/2, UO126 (UO) o Rapamicina (Indolfi,) durante 1h. A continuación las células fueron estimuladas durante 30 minutos con TSH, Forskolina (Forsk) (A y B) o IGF1 (C). Tras el tratamiento las células fueron recolectadas para la detección mediante Western-blot de los niveles de pGSK3 β y de GSK3 β . Se detectaron los niveles de pAKT y AKT1/2, pERK y ERK2 y p70S6K como control de la eficiencia de los inhibidores LY y Akt1/2, UO126 y Rapamicina respectivamente. Se muestra un ensayo representativo de 3 experimentos independientes.

La TSH activa principalmente a la quinasa PKA, aunque recientemente se ha descrito que otras quinasas como PI3K/Akt, ERK o mTOR1 (Cass, 1999; Brewer, 2007; De Gregorio, 2007; Nellore, 2009) pueden mediar el efecto de dicha hormona. Para estudiar que vías de señalización estaban implicadas en la inhibición de GSK3 β , células PCCL3 se incubaron durante una hora con inhibidores específicos de las distintas quinasas, y posteriormente se trataron durante 30 minutos con TSH.

La incubación con H89 y LY29002 (LY), inhibidores de PKA y PI3K respectivamente, bloqueó la acción de la TSH, produciendo una disminución del 80% y del 50% respectivamente en la fosforilación de GSK3 β (Fig 16 A). En consonancia con los resultados anteriores, el tratamiento durante 30 minutos con Forskolina, un activador de la adenilato ciclasa, también indujo la fosforilación de la GSK3 β (Fig 16 A y B). Por el contrario la incubación con UO126 y Rapamicina los inhibidores de MEK y del complejo TORC1 respectivamente, no alteraron los niveles de pGSK3 β inducidos por la TSH (Fig 16 B).

En el caso del IGF1, se ha descrito que además de la vía PI3K/Akt, este factor de crecimiento activa las vías de las MAPK (Burikhanov, 1996) y de TORC1 (Blancquaert, 2010). Utilizando inhibidores específicos de estas vías, se encontró que solo la inhibición de las quinasas PI3K/Akt resultó en una disminución de la fosforilación de GSK3 β inducida por IGF1 (Fig 16 C).

Estos resultados demuestran que la TSH y el IGF1 a través de la activación de las vías PKA y PI3K inducen la fosforilación de GSK3 β , inhibiendo su actividad. Dado que este hecho se correlaciona con la acumulación de β catenina en el núcleo quisimos analizar si este evento, que previamente hemos descrito, dependía de la activación de dichas quinasas.

Utilizando inhibidores específicos de las distintas vías mostramos que la acumulación nuclear de β catenina en respuesta a TSH era dependiente de la activación de PKA y Akt (Fig 17 A), mientras que la de IGF1 fue dependiente de Akt (Fig 17 B).

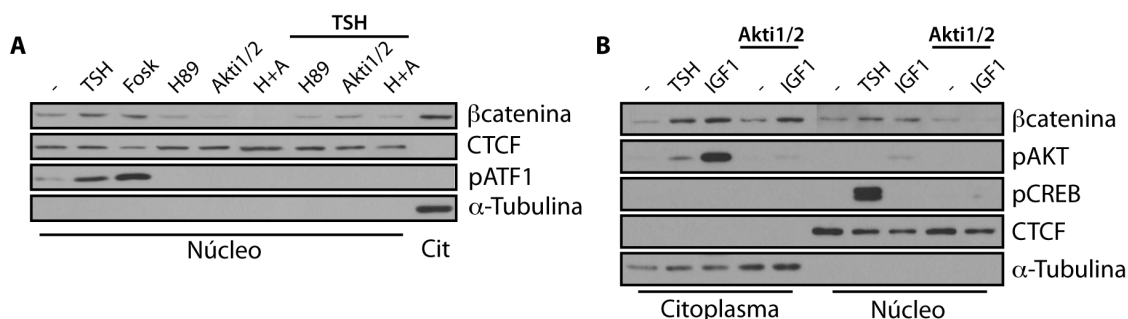


Fig.17-. Vías de señalización implicadas en la acumulación de β catenina en el núcleo en respuesta a TSH e IGF1. Se cultivaron células PCCl3 en medio basal durante 48 horas y posteriormente fueron mantenidas en este medio (-) o se trataron 1h con H89, Akti1/2 o los dos inhibidores juntos (H+A). A continuación las células fueron estimuladas durante 2 h con TSH, Forskolina (Forsk) (A) o IGF1 (B). Se obtuvieron extractos nucleares o citoplasmáticos y se analizaron mediante Western-blot los niveles de β catenina en cada fracción. Se detectaron los niveles de α -tubulina y CTCF como control de carga de los extractos citoplasmáticos y nucleares respectivamente y para controlar la pureza de cada fracción. Se detectaron los niveles de pAKT, pCREB y ATF1 como control de la eficiencia de los inhibidores. Se muestra un ensayo representativo de 3 experimentos independientes.

Las fosforilaciones que CK1 y GSK3 β median sobre la β catenina, en los residuos S45 y S33/37/T41 respectivamente, promueven su degradación por el proteasoma. Estas fosforilaciones disminuyen en respuesta a los factores Wnt a través de la activación de sus receptores Fz-LRP, ya que estos impiden la interacción de GSK3 β y CK1 con la β catenina, lo que conlleva la acumulación de la misma. Por ello quisimos analizar si la inhibición de la GSK3 β en respuesta a TSH e IGF1 alteraba dichas fosforilaciones y en consecuencia los niveles totales de β catenina.

Con este fin analizamos las fosforilaciones en los residuos S45 y S33/37/T41 en respuesta a TSH, Forskolina e IGF1 utilizando de nuevo el Li como control positivo. Los resultados mostraron que la TSH y el IGF1 inducían la fosforilación de β catenina en la S45 mientras que el IGF1 y el LiCl no (Fig 18). Dicho aumento no se correlacionó con un aumento en la fosforilación en los residuos S33/37/T41 en respuesta a TSH o Forskolina ni con una disminución de los niveles totales de β catenina indicando que TSH, Forskolina e IGF1 no variaban los niveles de expresión de β catenina a tiempos cortos de estimulación. Mientras que la inhibición de GSK3 β tras el tratamiento con LiCl redujo la fosforilación de β catenina en la S33/37/T41 y aumentó ligeramente los niveles totales de β catenina.

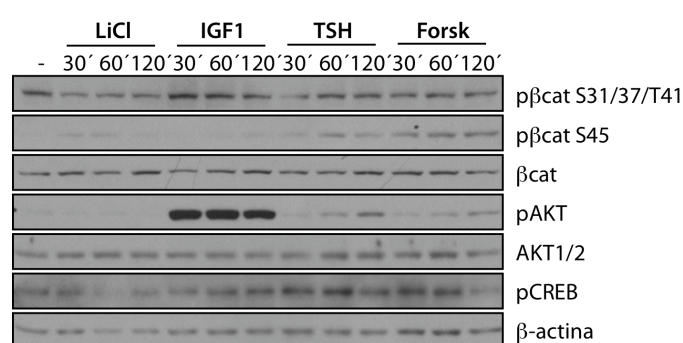


Fig.18-. TSH e IGF1 no regulan los niveles de expresión de β catenina. Se cultivaron células PCC13 en medio basal durante 48 horas y posteriormente fueron mantenidas en este medio (-) o se trataron con TSH, Forskolina (Forsk) (A) o IGF1 (B) durante 30, 60 y 120 min, o con LiCl durante 30, 60 y 120 min como control positivo. Tras el tratamiento las células fueron recolectadas para la detección mediante Western-blot de los niveles de pβcatS45, pβcatS31/37/T41 y de βcat. Se detectaron los niveles pCREB y de pAKT como control de la actividad de TSH, Forskolina e IGF1 respectivamente y AKT1/2 como control de carga. Se muestra un ensayo representativo de 3 experimentos independientes.

En conjunto estos datos indican que la TSH y el IGF1 promueven la localización nuclear de β catenina de forma dependiente de la activación de las quinasas PKA y PI3K/Akt y de la inhibición de GSK3 β pero sin alterar la expresión de β catenina.

1.3-. TSH e IGF1 inducen un aumento de la actividad transcripcional de β catenina

Como hemos visto la TSH y el IGF1 inducen la localización citoplasmática y nuclear de β catenina, sin aumentar su cantidad total. En el núcleo β catenina se une a factores de transcripción de la familia TCF/LEF, que se encuentran unidos a secuencias WRE situadas en los promotores de sus genes diana. Para analizar si la acumulación nuclear de β catenina inducida por TSH e IGF1 se correlacionaba con un aumento en su actividad transcripcional, realizamos transfecciones transitorias con el sistema de vectores dependientes del complejo β catenina/TCF, denominados Super8x Top y Fop Flash y descritos en materiales y métodos.

Para ello células PCC13 previamente transfectadas con los vectores Top o Fop, se mantuvieron 48 horas en medio basal estimulándose posteriormente durante 24 horas con TSH, IGF1 o ambos ligandos y usando como control positivo se utilizó el Li. Tanto los tratamientos con TSH como con IGF1 indujeron la activación de los promotores β catenina/TCF dependientes (Fig 19) siendo el efecto de la TSH mediado por cAMP ya que fue reproducido por la Forskolina. Esta activación aunque no fue muy alta, fue significativa y comparable a la inducida por el factor Wnt3A en las células PCC13.

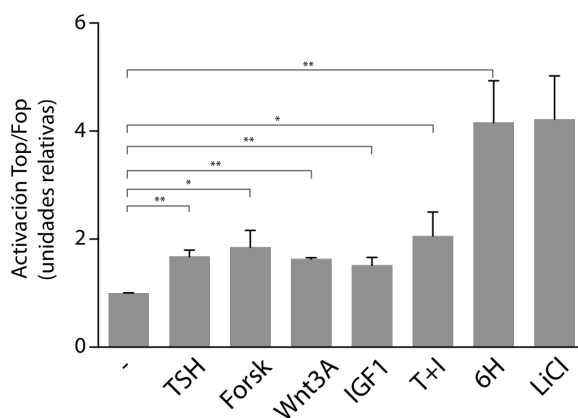
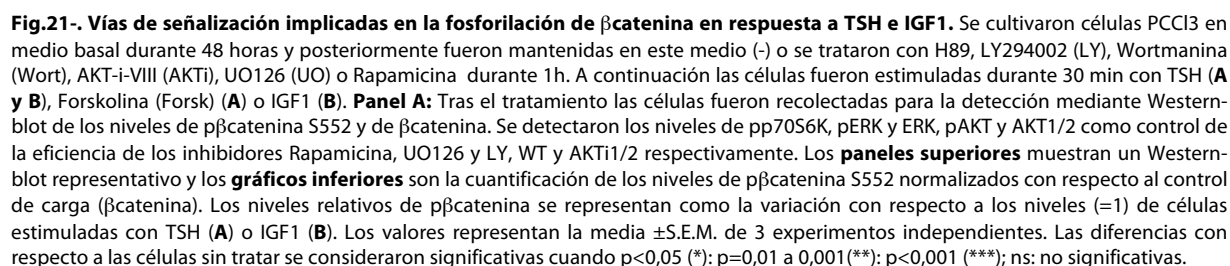
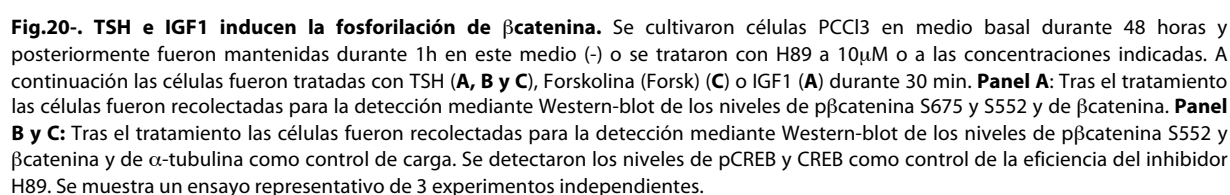


Fig.19-. Regulación de los promotores dependientes de β catenina/TCF por TSH e IGF1. Se transfectaron células PCCl3 con 1,2 μ g de Super8xTopFlash o Super8xFopFlash y 50 ng de pRL-CMV. Tras la transfección, las células fueron cultivadas durante 48h en medio basal y posteriormente se mantuvieron en estas condiciones (-) o fueron tratadas con TSH, Forsk, IGF1, TSH+IGF1 (T+I) o medio 6H, LiCl y Wnt3A como controles positivos durante 24h. Transcurrido este tiempo las células fueron recogidas para determinación de la actividad luciferasa y renilla. La actividad luciferasa se calculó como unidades de luz normalizadas con respecto a la actividad renilla generada a partir del vector pRL-CMV. La actividad β catenina/TCF específica se calculó obteniendo el ratio de las actividades de los promotores Top/Fop y es expresada de manera relativa como el número de veces de activación sobre los niveles (=1) de células sin tratamiento. Los datos representan la media \pm S.E.M. de 3 experimentos independientes. La significancia estadística de los datos se evaluó mediante un análisis t-test (two tailed). Las diferencias con respecto a las células sin tratar se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ (*), $p = 0,01$ a $0,001$ (**).

El hecho de que la TSH y el IGF1 indujeran la actividad transcripcional de β catenina sin aumentar sus niveles de proteína nos hizo plantearnos por que mecanismo se estaba acumulando en citoplasma y núcleo. Los niveles citoplasmáticos de β catenina se pueden inducir inhibiendo la degradación de la proteína que se sintetiza *de novo* o movilizándolo la fracción de β catenina que forma parte de las uniones adherentes. Se ha descrito que las fosforilaciones en el extremo N terminal, como ocurre con la fosforilación en el residuo Y654 o la S552, debilitan la unión de β catenina a Ecadherina favoreciendo la estabilización de ésta en el citoplasma y facilitando la aparición de segundas fosforilaciones como las producidas en el residuo de S675. Esta última fosforilación junto con la producida en la S552 favorecen la entrada al núcleo de la β catenina y aumentan su capacidad como co-activador transcripcional al favorecer la unión de histonas acetilasas como CBP/p300.

Se ha descrito que Akt/PKA y PKA fosforilan los residuos de serina 552 y 675 respectivamente en otros tipos celulares (Taurin, 2006; Fang, 2007). Dado que estás vías son las que median en el efecto de TSH e IGF1 decidimos analizar si estos factores inducían la fosforilación de la β catenina. Para ello se estimularon células PCCl3 con TSH o IGF1 durante 30 minutos y posteriormente se analizaron mediante WB los niveles de β catenina fosforilada en los residuos serina 552 y 675.

La TSH pero no el IGF1 indujo un aumento en la fosforilación de β catenina en el residuo S675. Este fue dependiente de PKA, ya que la fosforilación disminuyó al tratar las células previamente con H89, inhibidor de PKA (Fig 20 A). Por el contrario tanto TSH como IGF1 indujeron la fosforilación de β catenina en el residuo S552, siendo la activación inducida por TSH mucho mayor que la del IGF1 (Fig 20 A).



50

β catenina en respuesta a TSH o a Forskolina (Fig 20 B y C). Por el contrario el uso de inhibidores específicos de PI3K, MEK o TORC1, no modificó la fosforilación inducida por TSH en el residuo S552 (Fig 21 A) lo que refuerza el papel de la PKA como mediadora del efecto. La leve fosforilación inducida por IGF1 se bloqueó al preincubar las células con Akti1/2, un inhibidor de Akt, mientras que los inhibidores de MEK o TORC1 no modificaron dicha fosforilación (Fig 21 B).

1.4-. La expresión de β catenina está regulada por cAMP en cultivos primarios de tirocitos

Para estudiar la regulación de β catenina en un contexto más fisiológico establecimos cultivos primarios de tirocitos de ratón (Fig 22 A). Para ello se aislaron folículos tiroideos de ratón, se crecieron en medio completo 6H durante 7 días y se confirmó la identidad del cultivo mediante el análisis de la expresión de los factores de transcripción tiroideos Pax8, Nkx2-1 y FoxE1 (Fig 22 B).

Para analizar la regulación de la β catenina se cultivaron los tirocitos durante 48 h en medio basal y posteriormente se estimularon con TSH o Forskolina durante 30 minutos utilizando células PCCl3 como control. Como se muestra en la figura 23 A, la estimulación con Forskolina indujo la fosforilación de la β catenina en los residuos S552 y S675. Por el contrario la TSH no modificó la fosforilación de β catenina. Esto se debe a que en nuestras condiciones experimentales los tirocitos pierden la expresión del *TSHR* (Fig 23 B) y en consecuencia no se activa CREB en respuesta a TSH como se muestra en los extractos nucleares de tirocitos, mientras que si se activa en respuesta a la Forskolina (Fig 23 C).

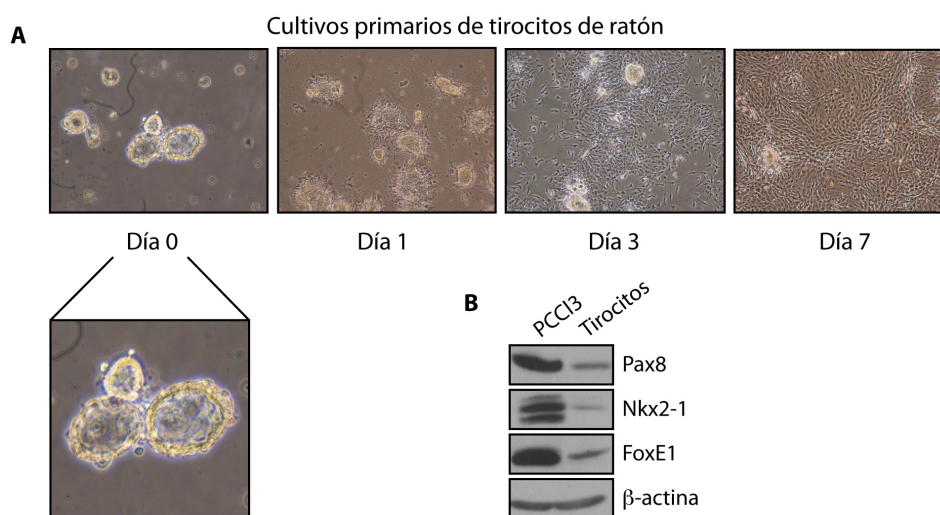


Fig.22-. Establecimiento de cultivos primarios de ratón. Panel A: Cultivos primarios de tirocitos de ratón a diferentes tiempos (días 1, 3 y 7) después de ser aislados (día 0) visualizados en un microscopio de campo claro y con un objetivo de 40 aumentos. Las células forman estructuras foliculares (ver aumento de la imagen a día 0). Panel B: Se cultivaron tirocitos de ratón y células PCCl3 durante 7 días en medio 6H. Posteriormente las células fueron recolectadas para la detección mediante Western-blot de Pax8, Nkx2-1, FoxE1 y β -actina como control de carga.

A continuación analizamos la expresión de la β catenina en extractos nucleares y citoplasmáticos de cultivos primarios estimulados con TSH y Forskolina. Como se muestra en el western blot y en su cuantificación (Fig 23 C) el tratamiento con Forskolina indujo un ligero aumento en los niveles de

β catenina en la fracción nuclear, aumento que fue confirmado mediante microscopía confocal (Fig 23 D).

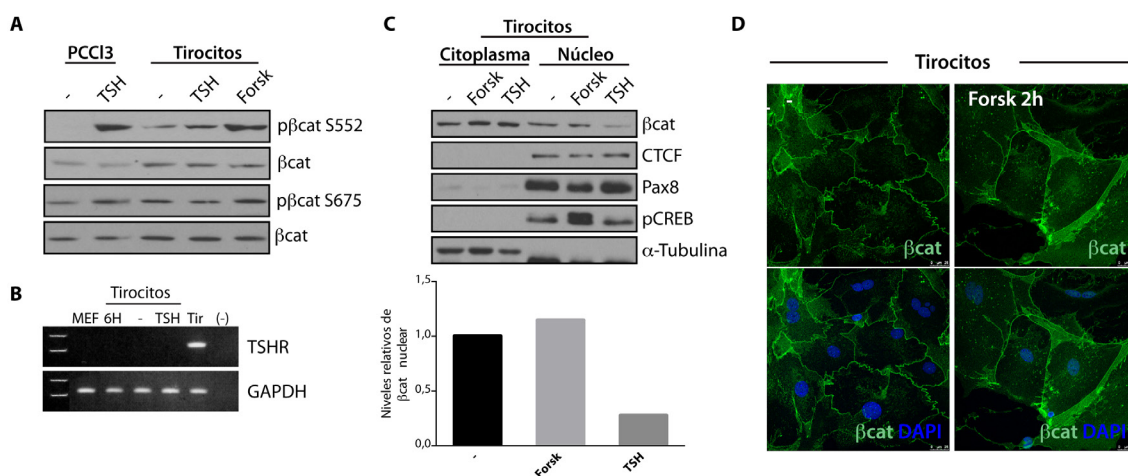


Fig.23-. Expresión de β catenina en cultivos primarios de ratón. **Panel A:** Cultivos primarios de ratón (tirocitos) y células PCC13 fueron cultivadas en medio 6H durante 7 días y a continuación se mantuvieron en medio basal durante 48h. Posteriormente las células se mantuvieron en el mismo medio (-) o fueron estimuladas con TSH o Forskolina durante 30 minutos y recolectadas para detectar la expresión de p β catenina S552 o S675 y β catenina como control de carga. **Panel B:** RNA fue extraído y retro-transcrito de cultivos primarios de ratón mantenidos en medio 6H o en medio basal y posteriormente estimuladas con TSH durante 24 horas para la posterior detección mediante PCR de los niveles del mRNA del TSHR y de GAPDH como control de carga. Como control positivo y negativo de la expresión del TSHR se utilizó RNA de tiroides (Tir) o de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) respectivamente. **Panel C y D:** Cultivos primarios de ratón fueron crecidos durante 7 días en medio 6H y 2 días en medio basal tras los cuales se mantuvieron en el mismo medio (-) o fueron estimuladas con TSH o Forskolina durante 2 h. **Panel C.** A continuación se obtuvieron extractos nucleares o citoplasmáticos y se analizaron mediante Western-blot (**panel superior**) los niveles de β catenina en cada fracción. Se detectaron los niveles de CTCF y α -tubulina como control de carga de los extractos nucleares y citoplasmáticos respectivamente y para controlar la pureza de cada fracción. Además se detectó pCREB como control de la actividad de la TSH/cAMP y Pax8 para confirmar la identidad del cultivo celular. En el **panel inferior** se muestra la cuantificación de los niveles de β catenina nuclear. **Panel D** Se determinó la localización subcelular de β catenina mediante inmunofluorescencia, utilizando un microscopio confocal con un objetivo de 63 aumentos. Se observa la inmunodetección de β catenina y su superposición con la tinción nuclear (DAPI).

Estos resultados apuntan a que el mecanismo descrito en las células PCC13 y FRTL5 está conservado en células tiroideas de ratón.

1.5-. La expresión β catenina está regulada por TSH en el tiroides de ratón

En el tiroides adulto en ratón la β catenina se haya localizada principalmente en las uniones adherentes, aunque también se localiza en el citoplasma de muchas células foliculares (Fig 24). Para estudiar el efecto de la TSH sobre la β catenina en el tiroides, generamos ratones hiper e hipotiroideos mediante la administración de T_3/T_4 y metimazol (MMI) respectivamente en el agua de bebida y se analizó por inmunohistoquímica la expresión de β catenina. La administración de T_3 y T_4 promueve niveles altos de estas hormonas en sangre, por lo que se inhibe la secreción de TSH y con ello la función tiroidea. Por otro lado el MMI actúa inhibiendo la actividad enzimática de la TPO y con ello la producción de hormonas tiroideas por lo que estos ratones presentan niveles de TSH elevados.

Como se muestra en la figura 24 los ratones hipertiroideos (T_3/T_4) presentan folículos más grandes formados por células aplanadas lo que se corresponde con un fenotipo característico de esta situación fisiológica. En estos tiroides, la expresión de β catenina está reducida en comparación

con los tiroides de los ratones controles localizándose en las uniones adherentes. Por el contrario en los ratones hipotiroideos (MMI), que presentan folículos más pequeños y con células cuboidales, la expresión de β catenina se encuentra aumentada con respecto a los controles, localizándose tanto en las uniones adherentes como en el citoplasma y núcleo de las células foliculares.

Estos resultados junto con los obtenidos *in vitro* con líneas inmortalizadas y cultivos primarios demuestran que la TSH y el IGF1 regulan la localización y actividad de β catenina.

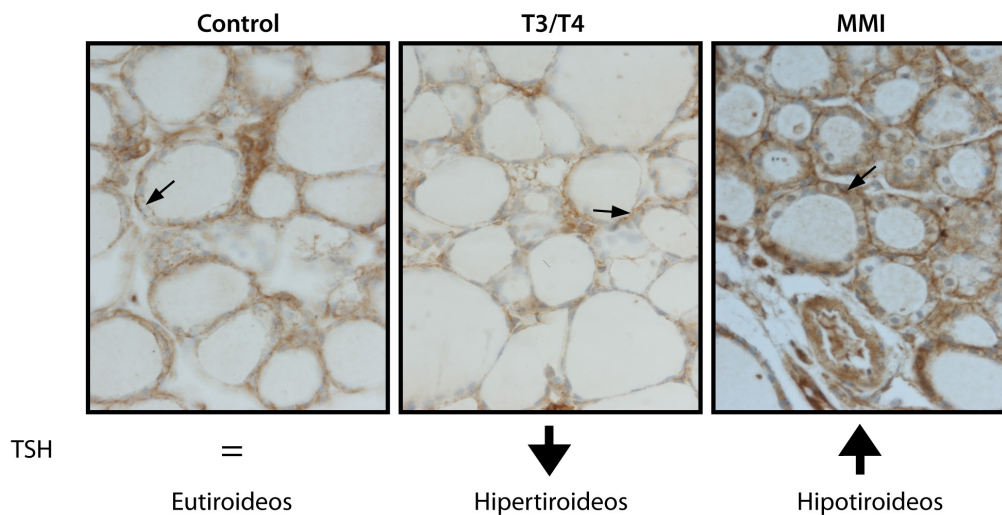


Fig.24-. Inmunodetección de β catenina en el tiroides de ratón. Se obtuvieron secciones sagitales de glándulas tiroideas pertenecientes a ratones control (Eutiroideos), tratados con T3 y T4 (Hipertiroideos) y tratados con Metimazol (MMI)(Hipotiroideos). Posteriormente se detectó la expresión de β catenina mediante inmunohistoquímica y se contratiñeron las secciones con hematoxilina.

1.6-. TSH e IGF1 inducen proliferación de forma dependiente de β catenina a través de la expresión de ciclinaD1

En tirocitos de rata la TSH y el IGF1 inducen la entrada en la fase S del ciclo celular, a través de la expresión de los genes de ciclo celular c-myc y ciclinaD1 entre otros (Fusco, 1987; Pirson, 1996; Lewis, 2004; Fukushima, 2008). Este efecto lo confirmamos en nuestro sistema experimental de células PCCI3 (Fig 12 A). Ambos genes son dianas clásicas del complejo β catenina/TCF (He, 1998; Tetsu, 1999). Por ello nos preguntamos si la β catenina podía estar mediando los efectos de la TSH y del IGF1 en la proliferación celular tiroidea.

Con el fin de demostrar esta hipótesis nos planteamos inhibir de forma estable la expresión de la β catenina y analizar si este hecho afectaba a la proliferación inducida por los dos ligandos TSH e IGF1. Para ello infectamos células PCCI3 con lentivirus que contenían un shRNA control o un shRNA contra el mRNA de β catenina (shscramble y sh β cat respectivamente) obteniendo un silenciamiento cercano al 100% de la expresión de β catenina (Fig 25 C). A continuación se midió la síntesis de DNA en respuesta a la TSH o al IGF1 mediante un ensayo de incorporación de BrdU.

La disminución de los niveles de β catenina redujo de forma significativa la síntesis de DNA inducida por TSH, IGF1 o ambos estímulos juntos, en comparación con las células control

(shscramble) o las células sin infectar (Fig 25 B). Estos datos indican que β catenina es necesaria para la inducción de la síntesis de DNA en respuesta a los dos principales estímulos que regulan la proliferación celular tiroidea. Este hecho coincidió con la inhibición de la expresión de ciclinaD1 en respuesta ambos estímulos (Fig 25 C).

El gen de la ciclinaD1 es activado en respuesta al complejo β catenina/TCF, debido a que contiene una secuencia WRE en su promotor proximal (Tetsu, 1999). Para comprobar si la β catenina estaba modulando la transcripción de dicha ciclina a través de la unión a TCF, se generaron células PCCl3 expresando de forma estable un dominante negativo de TCF4 (dnTCF4), al que no se une la β catenina (Fuerer, 2010). Posteriormente se analizó la inducción de la ciclinaD1 en respuesta a TSH, IGF1 o ambos factores en esta línea celular. Como muestran los resultados, el bloqueo de la unión entre β catenina y TCF, impidió la expresión de ciclinaD1 en respuesta a los distintos estímulos hormonales (Fig 25 D).

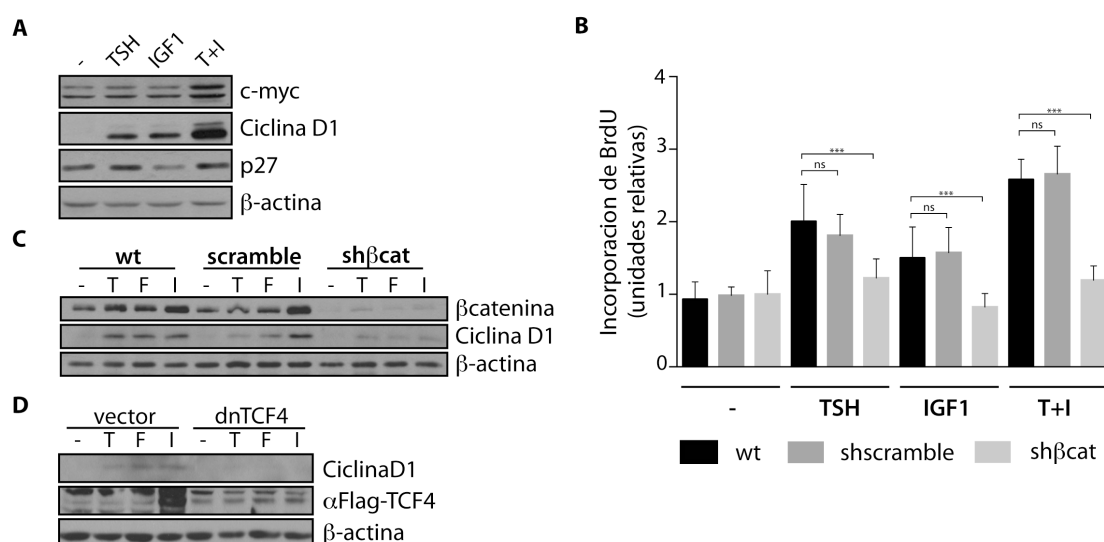


Fig.25.- Efecto de la inhibición de la expresión de β catenina sobre la síntesis de DNA. **Panel A:** Células PCCl3 fueron cultivadas en medio basal durante 48 h y posteriormente fueron mantenidas en el mismo medio (-) o tratadas con TSH, IGF1 o ambos factores (T+I) durante 12 h. Tras el tratamiento las células fueron recolectadas para la detección mediante Western-blot de los niveles de c-myc, ciclinaD1, p27 y β -actina como control de carga. **Panel B y C:** La expresión de β catenina fue inhibida en células PCCl3 mediante la infección con lentivirus expresando un shRNA específico (sh β cat) o un shRNA no codificante (ShScramble) como control. **Panel B:** Células PCCl3 sin infectar e infectadas con los lentivirus sh β cat y shScramble fueron tratadas con nocodazol 0,4 μ g/ μ l durante 16 horas y posteriormente fueron cultivadas en medio basal (-) o en medio basal con TSH, IGF1 o ambos (T+I) durante 24 horas y tratadas con BrdU 2h más. A continuación fueron fijadas y tratadas para medir la incorporación de BrdU. Los resultados muestran la incorporación de BrdU en unidades relativa como el número de veces de incorporación sobre los niveles (=1) de células sin tratamiento. Los datos representan la media \pm S.D. (n=8) de un ensayo representativo de 3 experimentos independientes. La significancia estadística de los datos se evaluó mediante un análisis t-test (two tailed). Las diferencias con respecto a las células shScramble se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ a $0,001$ (**); $p < 0,001$ (***); ns: no significativas. **Panel C:** Células PCCl3 sin infectar (wt) e infectadas con los lentivirus sh β cat y shScramble fueron cultivadas en medio basal y a continuación fueron mantenidas en el mismo medio (-) o tratadas con TSH, Forsk o IGF1 (T, F, I) durante 12 horas. Posteriormente las células fueron recolectadas para la detección mediante Western-blot de ciclinaD1 y β -actina como control de carga. Se detectó la expresión de β catenina como control del funcionamiento del shRNA. **Panel D:** Se sobre-expresó el dominante negativo TCF4 (Flag-dnTCF4) en células PCCl3 mediante la infección lentiviral del plásmido EdtP. Se infectaron células PCCl3 con el lentivirus shScramble como control (vector). Dichas células se cultivaron 48 horas en medio basal y a continuación se mantuvieron en el mismo medio (-) o fueron tratadas con TSH, Forsk e IGF1 durante 12 h. Posteriormente las células fueron recolectadas para la detección mediante Western-blot de ciclinaD1 y β -actina como control de carga. Se detectó la expresión de Flag como control de la expresión del Flag-dnTCF4. **A, C y D** Se muestra un Western-blot representativo de 3 experimentos independientes.

Con el fin de confirmar que la β catenina era la responsable de la expresión de la ciclinaD1 en nuestro sistema celular, analizamos la expresión de dicha ciclina en líneas estables de células PCC13 que expresaban un mutante de β catenina resistente a la degradación proteasomal denominado β catenina^{4A} (vector lentiviral E[beta]C descrito en materiales y métodos (Fuerer, 2010 #193). Este mutante, al no degradarse, se acumula en la fracción citoplasmática y nuclear donde activa la expresión de sus genes diana.

Para generar esta línea infectamos células PCC13 con el lentivirus E[beta]C que expresa la proteína β catenina^{4A} y la proteína fluorescente Cherry. Seleccionamos mediante citometría de flujo la población Cherry positiva (Fig 26 A) y para asegurarnos de que la proteína β catenina^{4A} se estaba expresando de forma apropiada analizamos el estatus de la vía Wnt en estas células utilizando las células negativas para la proteína Cherry como control. Como se muestra en la figura 26 B y C esta línea celular expresaba más β catenina y tenía una mayor activación basal de su actividad transcripcional en comparación con las células control, indicando que la β catenina^{4A} se estaba expresando de forma correcta (Fig 26 B y C).

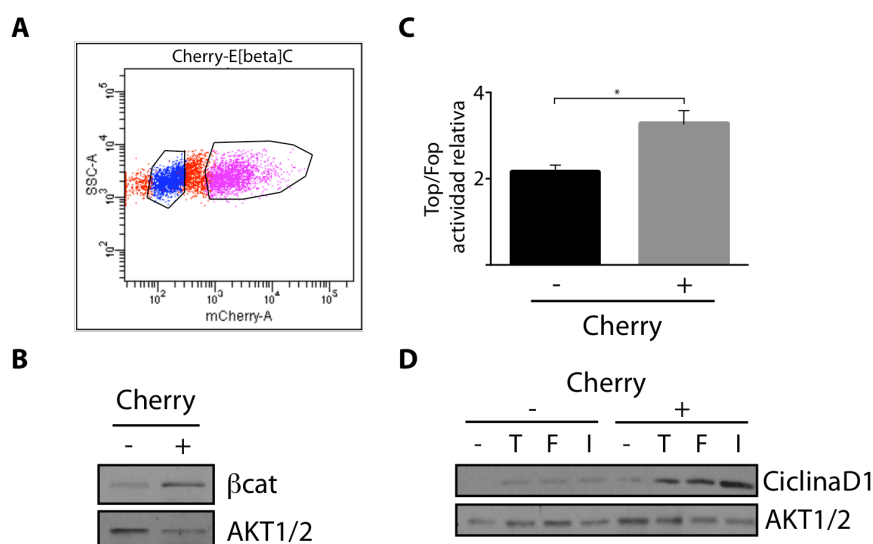


Fig.26-. Efecto de la sobre-expresión de β catenina sobre la expresión de ciclinaD1. **Panel A:** Células PCC13 fueron infectadas con el lentivirus que contenía el vector de expresión del mutante de β catenina^{4A} y la proteína fluorescente Cherry (vector E[beta]Cherry). A continuación se seleccionaron las células Cherry positivas por citometría de flujo (población morada) utilizando las células negativas como control (población azul). **Panel B:** Células PCC13 Cherry negativas (-) y positivas (+) se cultivaron en medio 6H y posteriormente se recolectaron para la detección mediante Western-blot de β catenina y ATK1/2 como control de carga. **Panel C:** Células PCC13 Cherry negativas (-) y positivas (+) fueron transfectadas con 1,2 μ g de Super8xTopFlash o Super8xFopFlash y 50 ng de pRL-CMV. Tras la transfección, las células fueron cultivadas durante 24h en medio 6H y transcurrido este tiempo las células fueron recogidas para determinación de la actividad luciferasa y renilla. La actividad luciferasa se calculó como unidades de luz normalizadas con respecto a la actividad renilla generada a partir del vector pRL-CMV. La actividad β catenina/TCF específica se calculó obteniendo el ratio de las actividades de los promotores Top/Fop y es expresada de manera relativa como el número de veces de activación sobre los niveles (=1) de células Cherry negativas. Los datos representan la media \pm S.D. (n=3) de 2 experimentos independientes. La significancia estadística de los datos se evaluó mediante un análisis t-test (two tailed). Las diferencias con respecto a las células Cherry negativas se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ (*). **Panel D:** Células PCC13 Cherry negativas (-) y positivas (+) fueron cultivadas en medio basal durante 48 h y a continuación fueron mantenidas en el mismo medio (-) o tratadas con TSH, Forsk o IGF1 (T, F, I) durante 12 horas. Posteriormente las células fueron recolectadas para la detección mediante Western-blot de ciclinaD1 y AKT1/2 como control de carga. Se muestra un Western-blot representativo de 3 experimentos independientes.

Posteriormente analizamos los niveles de expresión de ciclinaD1 en condiciones basales y en respuesta a TSH, Forsk e IGF1. Encontramos que la expresión de ciclinaD1 estaba aumentada tanto

en las células sin estimular como en las células estimuladas con TSH, Forskolina o IGF1 en comparación con los controles lo que confirmaba que la β catenina regula la expresión de la ciclinaD1 (Fig 26 D).

Este conjunto de datos indican que la β catenina es necesaria para la inducción de la proliferación de las células tiroideas en respuesta a la TSH/cAMP y al IGF1 a través de la expresión de los genes de fase G1 como ciclinaD1.

1.7-. β catenina regula la expresión de Pax8

Pax8 es un factor de transcripción de la familia *paired-box* crítico en el desarrollo de la glándula tiroidea y en el mantenimiento de la diferenciación del tiroides adulto. Pese a que se conoce que factores de transcripción como el Nkx2-1 y ligandos como la hormona TSH aumentan su expresión, no se conocen en detalle las señales que regulan la expresión de este factor durante la especificación tiroidea ni los mecanismos implicados en la acción de la TSH. El factor Pax8 también participa en la organogénesis de otros tejidos, como son el oído interno y el riñón. En este aspecto se describió la implicación de la vía Wnt/ β catenina en el desarrollo del riñón en ratas (Schmidt-Ott, 2007). En dicho artículo se describió que la β catenina regula la expresión de diversos genes de diferenciación renales, entre los que se encontraba Pax8. Además se identificaron en el promotor de Pax8 varias secuencias WRE a las que se unen los complejos β catenina/TCF activando su expresión. Dado que como hemos demostrado previamente, la TSH promueve la actividad transcripcional de β catenina/TCF, nos planteamos estudiar si Pax8 podría ser un gen diana de este complejo proteico en las células tiroideas.

Para comprobar esta hipótesis analizamos la expresión de Pax8 en respuesta a TSH, Forskolina e IGF1 en las células PCCI3 controles así como en dichas células silenciadas para β catenina. Como se observa en las células controles sin infectar o en las infectadas con el lentivirus shScramble, la TSH, la Forskolina y el IGF1 indujeron de forma eficiente la expresión de Pax8 (Fig 27 A). En células en donde la β catenina se había interferido (sh β cat), la expresión de Pax8 fue nula por lo que no se pudo detectar su inducción. Para analizar si este efecto era mediado a nivel transcripcional por los factores TCF, se analizó la inducción de Pax8 en respuesta a TSH, Forsk o IGF1 en células PCCI3 que expresaban el dominante negativo de TCF4. Como se muestra en la (Fig 27 B), la expresión del dnTCF4 redujo los niveles de Pax8.

En línea con los resultados anteriores en células PCCI3 que expresan la forma de β catenina resistente a degradación (β catenina^{A4}, Cherry+) los niveles basales de Pax8 se mantuvieron muy elevados aún en ausencia de TSH o Forskolina (Fig 27 C). El aumento en los niveles de la proteína Pax8 se debió a un aumento de la expresión de su mRNA como se muestra en la figura 27 D.

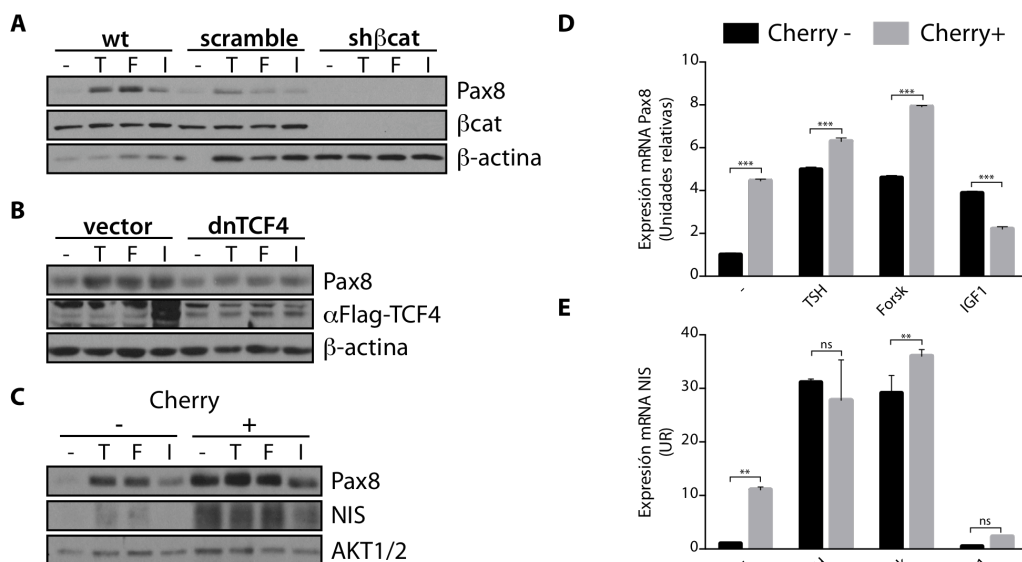


Fig.27-. Efecto de la inhibición de la expresión de βcatenina sobre la expresión de Pax8 y NIS. **Panel A:** La expresión de βcatenina fue inhibida en células PCC13 mediante la infección con lentivirus expresando un shRNA específico (shβcat). Células PCC13 sin infectar e infectadas con los lentivirus shβcat y shScramble fueron cultivadas en medio basal y a continuación fueron mantenidas en el mismo medio (-) o tratadas con TSH, Forsk o IGF1 (T, F, I) durante 12 horas. Posteriormente las células fueron recolectadas para la detección mediante Western-blot de Pax8 y β-actina como control de carga. Se detectó la expresión de βcatenina como control del funcionamiento del shRNA. **Panel B:** Se sobre-expresó el dominante negativo TCF4 (Flag-dnTCF4) en células PCC13 mediante la infección lentiviral del plásmido EdtP. Se infectaron células PCC13 con el lentivirus shScramble como control. Dichas células se cultivaron 48 horas en medio basal y a continuación se mantuvieron en el mismo medio (-) o fueron tratadas con TSH, Forsk e IGF1 durante 12 h. Posteriormente las células fueron recolectadas para la detección mediante Western-blot de Pax8 y β-actina como control de carga. Se detectó la expresión del péptido Flag como control de la expresión del Flag-dnTCF4. **Paneles C, D y E:** Células PCC13 Cherry negativas (-) y positivas (+) fueron cultivadas en medio basal durante 48 h y a continuación fueron mantenidas en el mismo medio (-) o tratadas con TSH, Forsk o IGF1 durante 12 horas. **Panel C:** Las células fueron recolectadas para la detección mediante Western-blot de Pax8, NIS y AKT1/2 como control de carga. **Panel D y E:** RNA fue extraído y retro-transcrito de células cherry negativas (-) y positivas (+) tratadas como se describe en C para la posterior detección mediante QPCR de los niveles del mRNA de Pax8 (D) y de NIS (E) relativos a la expresión de la β-actina. Los cambios de los niveles de mRNA con respecto a las células negativas fueron considerados significativos cuando $p < 0,05$ (*), $p = 0,01$ a $0,001$ (**), $p < 0,001$ (***); ns: no significativa. **A, B y C:** Se muestra un Western-blot representativo de 3 experimentos independientes.

Acorde con el aumento de la expresión de Pax8, la expresión del mRNA y proteína de su gen diana NIS se encontró muy elevada en condiciones basales (Fig 27 C y D).

Estos resultados demuestran que la βcatenina a través de la interacción con los factores de transcripción TCF/LEF regula la expresión de Pax8 en las células tiroideas. Es interesante destacar que el aumento en la expresión de Pax8 resultó en la alta expresión de un gen crítico en la función tiroidea como es NIS, lo que significa que la vía Wnt/βcatenina tiene un papel fisiológico no descrito previamente en tiroides.

1.7.1-. Regulación del promotor de Pax8

Con el objetivo de profundizar en la regulación de la expresión de Pax8 se estudió la presencia de sitios de unión de FT en su promotor mediante análisis *in silico* utilizando la base de datos de factores de transcripción *Transfact*. Este análisis reveló la existencia de secuencias consenso de unión para los factores de transcripción TCF/LEF y CREB así como una secuencia de unión para el factor de transcripción tiroideo Nkx2-1 (Fig 28 A). Además en un trabajo reciente de nuestro grupo en el que caracterizamos el transcriptoma de Pax8 mediante análisis de ChIP-Seq, se observó que Pax8 se unía a su promotor basal (Ruiz-Llorente, 2012). Utilizando la secuencia degenerada de

unión de Pax8 al DNA, que se definió en el anterior trabajo, encontramos un sitio putativo de unión situado en la misma región amplificada en el ChIP-Seq (Fig 28 A).

En base a la localización de estas secuencias decidimos clonar distintos fragmentos del promotor de Pax8 de rata fusionado al gen de la luciferasa con el objetivo de estudiar su funcionalidad. Los fragmentos clonados se describen en la figura 28 B. Para comprobar la especificidad de las construcciones, estas se transfectaron en células tiroideas (PCCl3 y FRTL5) o en células de carcinoma de cervix que no expresaban Pax8 (HeLa). Como muestran los resultados estos promotores se activaron de forma específica en las células tiroideas mientras que su actividad fue comparable a la del vector control en las células Hela. Es de destacar que las construcciones que contenían el fragmento correspondiente a la región intrónica (pPax8-2, 4 y 6) presentaban mayor actividad que el resto de las construcciones en las células tiroideas (Fig 28 C). Este hecho es importante en nuestro trabajo ya que el intrón1 de Pax8 contiene un sitio de unión a TCF funcional como se ha descrito en células renales de rata (Schmidt-Ott, 2007).

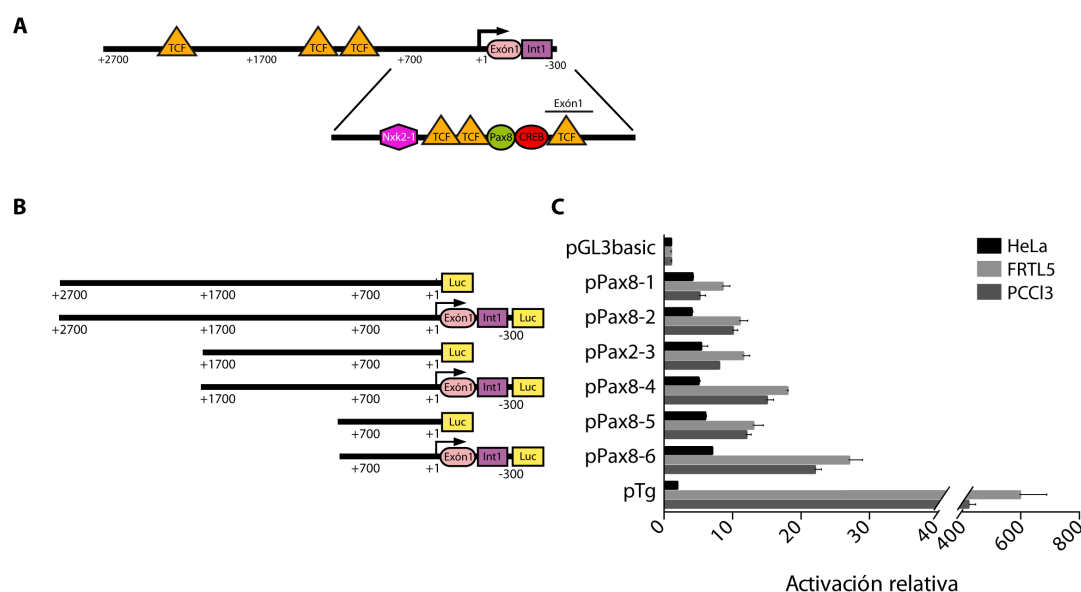


Fig.28-. Promotor basal de Pax8. **Panel A:** Representación esquemática del promotor basal de Pax8 de rata en el que están representados los sitios de unión putativos de los factores de transcripción TCF, Pax8, Nkx2-1 y CREB. **Panel B:** Representación esquemática de los fragmentos del promotor de Pax8 clonados en el vector pGL3basic. **Panel C:** Células Hela, FRTL5 y PCCl3 fueron transfectadas con 1,2µg de las construcciones 1-6 del promotor de Pax8, del promotor de Tiroglobulina (pTg) o del vector vacío pGL3basic como control y 50 ng de pRL-CMV. Tras la transfección las células fueron cultivadas durante 24h en medio completo y transcurrido este tiempo fueron recogidas para determinación de la actividad luciferasa y renilla. La actividad luciferasa se calculó como unidades de luz normalizadas con respecto a la actividad renilla generada a partir del vector pRL-CMV. La actividad específica de cada promotor es expresada de manera relativa como el número de veces de activación sobre los niveles (=1) de células transfectadas con el vector vacío pGL3basic. Los datos representan la media±S.D. (n=3) de 3 experimentos independientes.

La construcción pPax8-6 incluía los sitios putativos de unión de Nkx2-1, Pax8 y CREB así como tres de los sitios putativos de unión de TCF. Para evaluar la funcionalidad de estas secuencias se co-transfectaron células HeLa con esta construcción y vectores de expresión de los factores de transcripción indicados. Tanto Pax8 como Nkx2-1 activaron el promotor de Pax8 entre 6 y 9 veces, ejerciendo un efecto aditivo cuando se co-transfectaron juntos (Fig 29). La co-transfección con el

vector de expresión de CREB también activó el promotor de Pax8, duplicándose su activación cuando se co-transfectó junto con el vector de expresión de Pax8.

Para estudiar la relevancia de los sitios TCF identificados en el promotor de Pax8, se co-transfectaron células Hela con las distintas construcciones de dicho promotor junto con el vector de expresión de β catenina. Dado que en nuestra experiencia el vector de expresión de la β catenina *wild type* no había sido capaz de activar más de dos veces los promotores Top/Fop decidimos utilizar un mutante de β catenina resistente a la degradación por el proteasoma (β cat-S33Y) con el que logramos una activación eficiente de dichos promotores dependientes de β catenina (5-8 veces de activación).

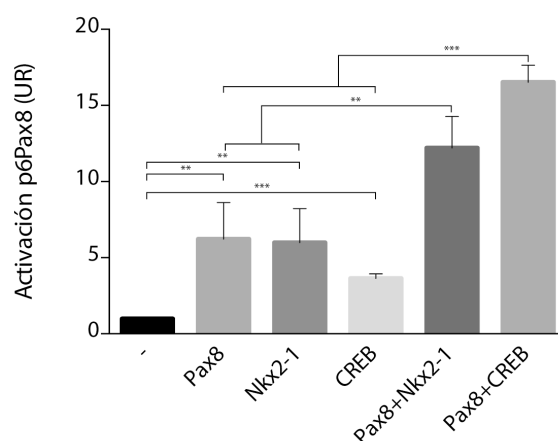


Fig.29-. Regulación de la actividad del promotor de Pax8 por Pax8, Nkx2-1 y CREB. Células Hela fueron transfectadas con 0,32 μ g del promotor p6Pax8 y 25 ng de pRL-CMV y 0,3 μ g de los vectores de expresión de Nkx2-1, CREB y Pax8, o del vector control pcDNA3.1. Tras la transfección las células fueron cultivadas durante 48h en medio completo y transcurrido este tiempo fueron recogidas para determinación de la actividad luciferasa y renilla. La actividad luciferasa se calculó como unidades de luz normalizadas con respecto a la actividad renilla generada a partir del vector pRL-CMV. La actividad del promotor de Pax8 es expresada de manera relativa como el número de veces de activación sobre los niveles (=1) de células transfectadas con el vector control. Los datos representan la media \pm S.E.M. de 3 experimentos independientes. La significancia estadística de los datos se evaluó mediante un análisis t-test (two tailed). Las diferencias con respecto a las células transfectadas con el vector control se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ (*), $p = 0,01$ a $0,001$ (**), $p < 0,001$ (***).

Como se muestra en la figura 30, las construcciones que contenían el fragmento intrónico (4 y 6) se activaron más que las que no lo contenían (3 y 5) cuando se co-transfectaron con β cat-S33Y, indicando la importancia del sitio WRE (a) (ver p3 vs. p4 y p5 vs. p6). Destacar que la construcción pPax8-5 no se activó de forma significativa en respuesta a β cat-S33Y indicando que los sitios WRE (b) y c no son relevantes en nuestro estudio. Sin embargo la presencia de los sitios WRE (d y e) incrementó significativamente la activación del promotor de Pax8 (ver p3 vs. p5), indicando que estos sitios son funcionales.

Estos resultados demuestran que los complejos β catenina/TCF aumentan la expresión de Pax8 en respuesta a TSH a través de la activación de su promotor. Además sugieren que la TSH podría estar activando la expresión de Pax8 a través de la activación de CREB. Por último demuestran que Pax8 activa a su propio promotor y que coopera con Nkx2-1 a través de un nuevo sitio de unión para activar su expresión, un hecho que puede ser importante durante el desarrollo embrionario.

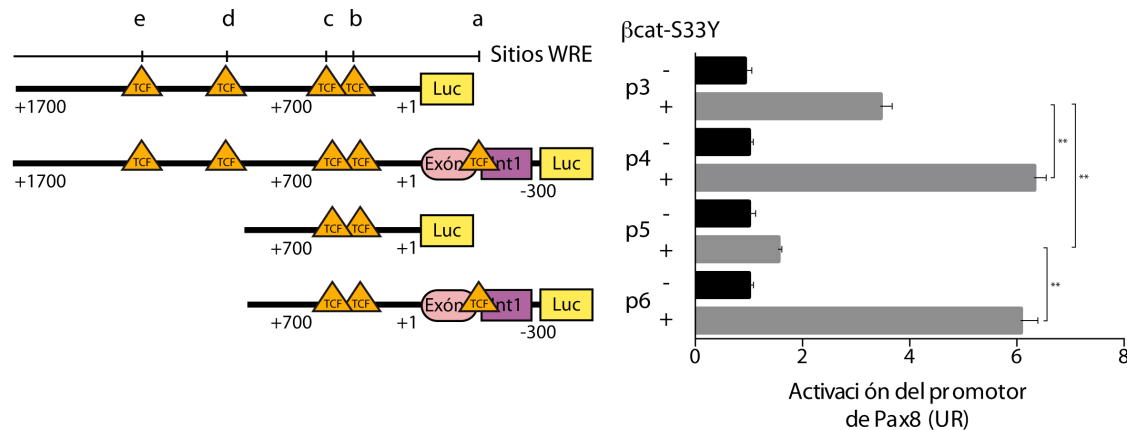


Fig.30-. Regulación de la actividad del promotor de Pax8 por βcatenina. Células HeLa fueron transfectedas con 0,32 μg de los promotores 3-6 de Pax8 y 25 ng de pRL-CMV y 0,3 μg del vector de expresión de βcatenina-S33Y o del vector control pcDNA3.1. A la izquierda se muestra una representación esquemática de las deleciones del promotor usadas, marcando los sitios de unión de TCF (WRE)(a-e). Tras la transfección las células fueron cultivadas durante 48h en medio completo y transcurrido este tiempo fueron recogidas para determinación de la actividad luciferasa y renilla. La actividad luciferasa se calculó como unidades de luz normalizadas con respecto a la actividad renilla generada a partir del vector pRL-CMV. La actividad de cada promotor de Pax8 es expresada de manera relativa como el número de veces de activación sobre los niveles (=1) de células transfectedas con el vector control. Los datos representados gráficamente a la derecha son la media±S.D. de un ensayo representativo de 3 experimentos independientes. La significancia estadística de los datos se evaluó mediante un análisis t-test (two tailed). Las diferencias con respecto a las células transfectedas con el vector control se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ (*), $p = 0,01$ a $0,001$ (**), ns: no significativas.

1.8-. βcatenina regula la actividad de Pax8

La TSH además de regular la expresión de Pax8 regula su actividad transcripcional. Se ha descrito que la TSH regula la unión de Pax8 al DNA a través de la modulación del estado redox de la célula (Kambe, 1996). Además se ha descrito que la PKA aumenta la actividad transcripcional de Pax8 (Baratta, 2009) pero no se han descrito los mecanismos implicados en esta regulación.

Durante los ensayos de caracterización del promotor de Pax8 observamos que la co-transfección de βcatenina con Pax8 aumentaba la activación mediada por Pax8, mientras que no tenía efecto sobre la activación mediada por Nkx2-1 (Fig 31 A). Dado que la TSH induce la localización nuclear de la βcatenina de forma dependiente de PKA (Fig 14 A), nos planteamos estudiar si la βcatenina podía estar actuando como un co-activador transcripcional de Pax8.

Para comprobar esta hipótesis se determinó la actividad transcripcional de Pax8 en presencia o ausencia del vector de expresión de βcat-S33Y en células HeLa, utilizando el vector Cp5-Luc que contiene 5 sitios de unión de Pax8 funcionales (Baratta, 2009). Como muestran los resultados, Pax8 por si solo indujo un aumento de 40 veces en la actividad del promotor Cp5, que se incrementó hasta 140 veces cuando se co-transfectó junto a βcat-S33Y; la transfección del vector de expresión de βcat-S33Y solo no activó el promotor Cp5-luc (Fig 31 B). Estos datos sugieren que la βcatenina podría co-activar a Pax8. Para verificar que esto también ocurría en el promotor de un gen tiroideo y por tanto no artificial, se analizó el efecto de la co-transfección Pax8 y βcat-S33Y sobre la activación del promotor de NIS (rNUE2.8-NIS).

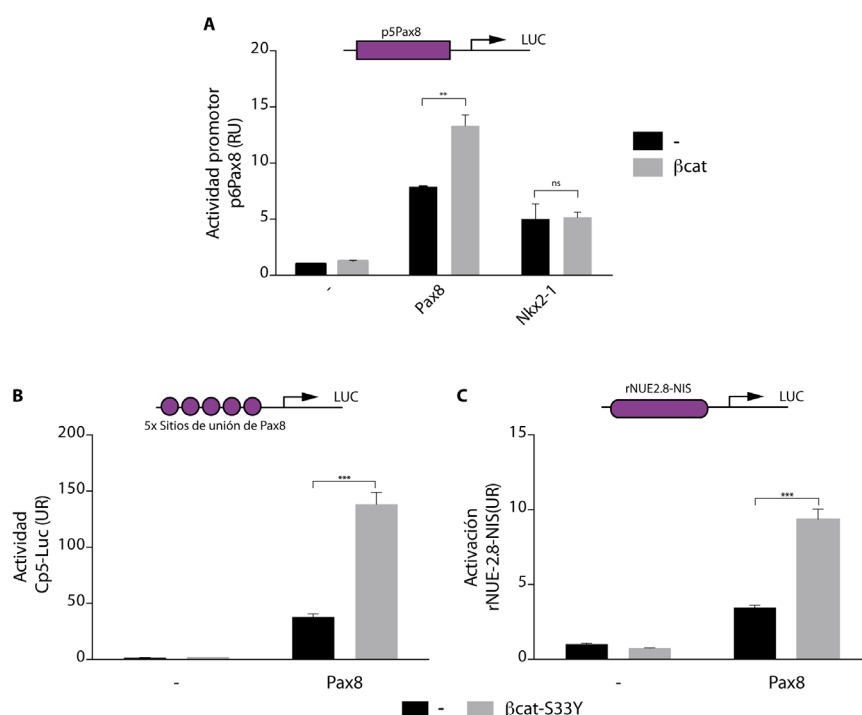


Fig.31-. Regulación de la actividad de Pax8 por βcatenina. Células Hela fueron transfectadas con 0,32 µg de los promotores: p6Pax6 (**Panel A**), Cp5-Luc (**Panel B**) o rNUE-2.8-NIS (**Panel C**), 25 ng de pRL-CMV y 0,25 µg de los vectores de expresión de βcatenina-S33Y, Pax8 y Nkx2-1 o del vector control pcDNA3.1. Tras la transfección las células fueron cultivadas durante 48h en medio completo y transcurrido este tiempo fueron recogidas para determinación de la actividad luciferasa y renilla. La actividad luciferasa se calculó como unidades de luz normalizadas con respecto a la actividad renilla generada a partir del vector pRL-CMV. La actividad de cada promotor es expresada de manera relativa como el número de veces de activación sobre los niveles (=1) de células transfectadas con el vector control. Los datos representan la media±S.E.M. de 3 experimentos independientes. La significancia estadística de los datos se evaluó mediante un análisis t-test (two tailed). Las diferencias con respecto a las células transfectadas solo con Pax8 se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ (*), $p = 0,01$ a $0,001$ (**), $p < 0,001$ (***), ns: no significativas.

Como muestran los resultados la co-transfección de la βcat-S33Y también aumentó la actividad transcripcional de Pax8 sobre el promotor de NIS, pero no modificó la actividad del promotor cuando se transfectó sola, confirmando los resultados anteriores (Fig 31 C).

Para comprobar si esta co-activación estaba conservada en un contexto tiroideo, analizamos la acción de la TSH y su agonista Forskolina sobre el promotor Cp5-Luc y el rNUE2.8-NIS en ausencia o presencia del vector de expresión de βcat-S33Y. De acuerdo con los resultados anteriores, la expresión de βcat-S33Y aumentó de forma significativa la activación de ambos promotores tanto en respuesta a la TSH como a la Forskolina (Fig 32 A y B).

Estos resultados apuntan a una cooperación entre βcatenina y Pax8 en la activación de los genes diana de Pax8. Para demostrar esta hipótesis analizamos la interacción física entre ambas proteínas mediante ensayos de co-inmunoprecipitación. Con ese fin obtuvimos extractos nucleares de células PCCl3 cultivadas en medio completo 6H (situación en la que se está expresando Pax8 y βcatenina se encuentra localizada en el núcleo), inmunoprecipitamos Pax8 utilizando un anticuerpo específico y detectamos mediante WB la presencia de βcatenina en el inmunocomplejo. Como se muestra en la figura 32 C βcatenina co-precipita junto con Pax8 confirmando dicha interacción física.

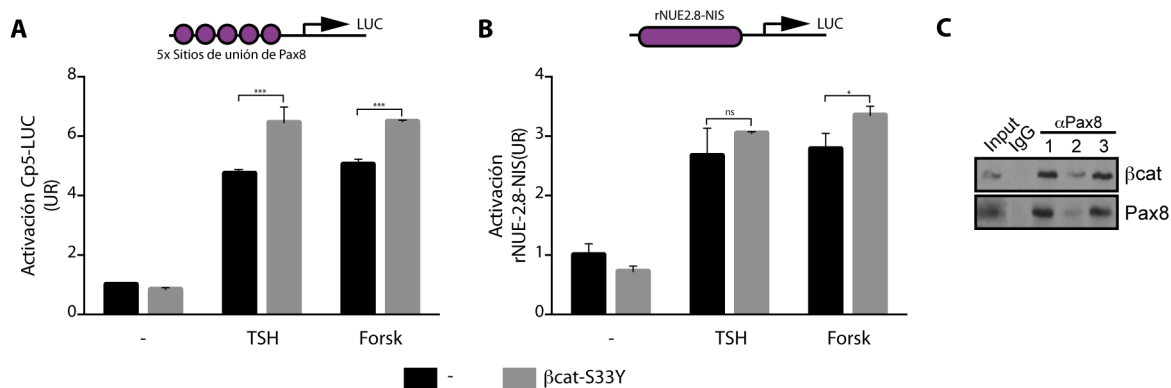


Fig.32-. Regulación de la actividad de Pax8 por βcatenina en respuesta a TSH. Células PCCl3 fueron transfectadas con 0,32 μg de Cp5-Luc (**Panel A**) o rNUE2.8-NIS (**Panel B**) y 50 ng de pRL-CMV y 0,25 μg del vector de expresión de βcatenina-S33Y o del vector control pcDNA3.1. Tras la transfección las células fueron cultivadas durante 48h en medio basal y a continuación fueron mantenidas en el mismo medio (-) o tratadas con TSH o Forskolina durante 24h. Transcurrido este tiempo las células se recogieron para determinación de la actividad luciferasa y renilla. La actividad luciferasa se calculó como unidades de luz normalizadas con respecto a la actividad renilla generada a partir del vector pRL-CMV. La actividad de cada promotor es expresada de manera relativa como el número de veces de activación sobre los niveles (=1) de células sin tratar y transfectadas con el vector control. Los datos representan la media±S.D. (n=3) de un ensayo representativo de 3 experimentos independientes. La significancia estadística de los datos se evaluó mediante un análisis t-test (two tailed). Las diferencias con respecto a las células transfectadas con el vector control se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ (*), $p = 0,01$ a $0,001$ (**), $p < 0,001$ (***), ns: no significativas. **Panel C:** Se obtuvieron extractos nucleares de células PCCl3 y se inmunoprecipitaron (IP) con tres anticuerpos distintos de Pax8 (1, 2 y 3) o un anticuerpo anti IgG como control. Posteriormente se detectó la presencia de βcatenina en el inmunocomplejo mediante Western-blot. El carril primero es el input (Extractos nucleares) y el carril segundo es la IP no específica. Se muestra un Western-blot representativo de 3 experimentos independientes.

2-. Función de la vía Wnt/βcatenina en cáncer de tiroides

Como hemos descrito en la introducción, la vía Wnt/βcatenina se encuentra constitutivamente activada en el 50% de los tumores de tiroides pobremente diferenciados y anaplásicos debido a la aparición de mutaciones en los genes de la βcatenina o la Axina (Garcia-Rostan, 1999; Garcia-Rostan, 2001; Ishigaki, 2002). Estas mutaciones impiden la correcta degradación de la βcatenina por lo que se acumula en el citoplasma y núcleo de las células tumorales activando la expresión de genes relacionados con proliferación. Así se ha correlacionado la expresión de la ciclinaD1, gen diana de la βcatenina, con la localización nuclear de esta última y con un mayor índice proliferativo (Lazzereschi, 1998; Ishigaki, 2002; Meirmanov, 2003; Rezk, 2004; Zhang, 2011).

En tumores diferenciados, papilares y foliculares (CPT y CFT respectivamente), se ha correlacionado de forma positiva la disminución de la expresión de βcatenina en la membrana plasmática y su localización en el citoplasma con un aumento del índice proliferativo (Garcia-Rostan, 2001). Contrariamente a lo que cabría esperar, dado que la βcatenina solo se ha detectado en el citoplasma de las células de estos tumores, se ha relacionado dicha localización con la expresión de ciclinaD1. Además resultados obtenidos *in vitro* han demostrado que el reordenamiento RET/PTC (solo presente en carcinomas papilares) induce la estabilización de la βcatenina por mecanismos independientes de factores Wnt, a través de la activación de las vías PI3K/Akt y MAPK (Castellone, 2009). La expresión de RET/PTC induce la acumulación nuclear y la

actividad transcripcional de la β catenina habiéndose descrito que la inhibición de la expresión de esta última reduce la capacidad tumorigénica de las células que expresan RET/PTC (Gujral, 2008).

Todos estos resultados sugieren que la vía Wnt/ β catenina podría tener un papel funcional en los tumores diferenciados (papilares y foliculares).

2.1-. El expresión del oncogén HRASV12, pero no la de BRAFV600E, induce la activación de la vía Wnt/ β catenina

Dado que el reordenamiento RET/PTC se encuentra tan solo en el 20% de los CPT y debido a la importancia de la vía Wnt/ β catenina en carcinogénesis, nos planteamos analizar la activación de dicha vía en respuesta a la expresión de los oncogenes HRAS y BRAF dos de los genes que aparecen mutados con mayor frecuencia en el cáncer de tiroides diferenciado.

Para llevar a cabo este estudio utilizamos las células PC-HRAS y PC-BRAF descritas en el apartado de "Líneas celulares". Este sistema nos permite inducir de forma condicional la expresión de dichos oncogenes en las células PCCl3, mediante la adición de doxíciclina al medio de cultivo. Ha sido previamente descrito que la sola activación de estos oncogenes promueve la transformación de estas líneas, por lo que suponen un buen modelo para estudiar los eventos iniciales de la carcinogénesis de las células tiroideas (Saavedra, 2000; Mitsutake, 2005).

Dado que en las células transfectadas con el oncogen RET/PTC, la β catenina se estabiliza en parte a través de la inhibición de la GSK3 β , en primer lugar analizamos su fosforilación en la serina 9 en las células PC-HRAS y PC-BRAF estimuladas con doxíciclina durante 48 horas.

Los resultados indicaron que las células PC-HRAS en presencia de doxíciclina expresaban niveles mayores de GSK3 β fosforilada que los controles sin doxíciclina (Fig 33 A). Por el contrario en las células PC-BRAF no se detectaron cambios en la fosforilación de GSK3 β . Estos resultados indicaban que la expresión del oncogén HRAS, pero no de BRAF, inducía la inhibición de GSK3 β .

Para comprobar si este hecho afectaba a la estabilidad y/o localización de la β catenina, se analizó la expresión de β catenina en extractos totales y nucleares de células PC-HRAS y PC-BRAF en ausencia o presencia de doxíciclina.

Como se muestra en la figura 30 B tanto la expresión del oncogén HRAS como la de BRAF aumentó moderadamente los niveles totales de β catenina. Sin embargo la expresión de HRAS y no de BRAF resultó en un aumento de β catenina en la fracción de proteína nuclear (Fig 33 C). Este último resultado fue confirmado analizando la localización subcelular de β catenina mediante inmunofluorescencia indirecta (Fig 33 D).

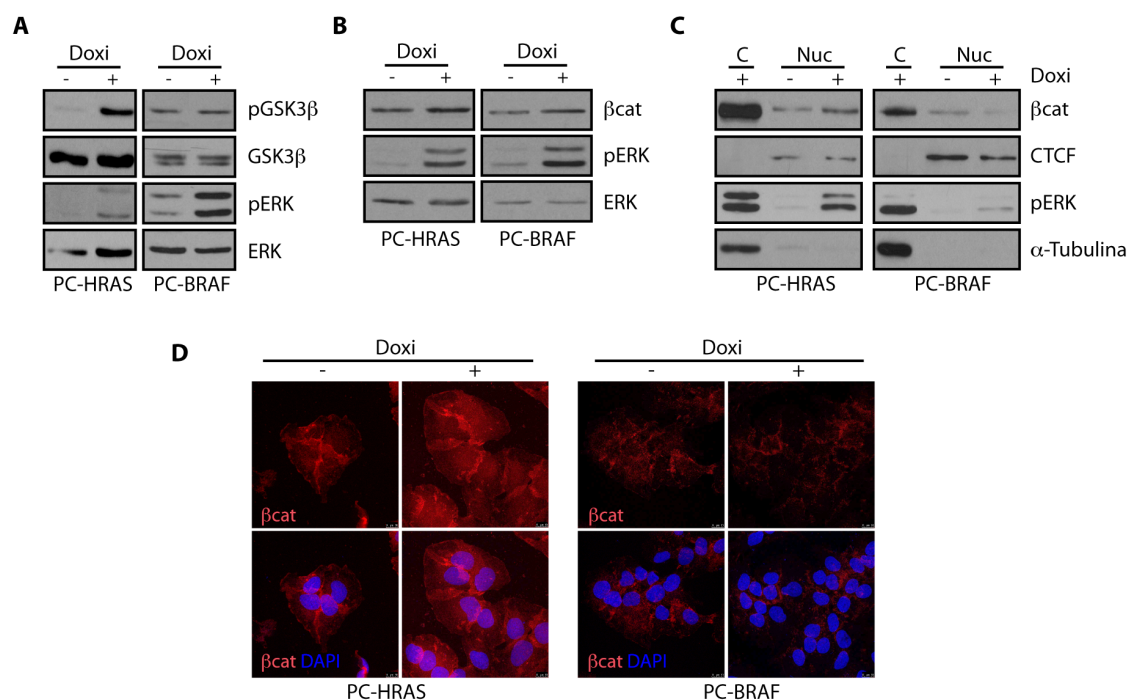


Fig.33-. Regulación de la expresión y localización de βcatenina en respuesta a la expresión de HRASV12 y BRAFV600E. Células PC-BRAF y PC-HRAS fueron cultivadas 48 horas en medio basal y a continuación fueron mantenidas en el mismo medio (-) o se trataron con doxiciclina durante 48 h. **Panel A y B:** Tras el tratamiento, las células fueron recolectadas para la detección mediante Western-blot de los niveles de pGSK3β y de GSK3β (A) o de βcatenina (B). Se detectaron los niveles de pERK y ERK como control de la activación de los oncogenes HRAS y BRAF. **Panel C:** Se obtuvieron extractos nucleares o citoplasmático de células PC-HRAS y PC-BRAF y se analizó mediante Western-blot los niveles de βcatenina en cada fracción. Se detectaron los niveles de α-tubulina y CTCF como control de carga de los extractos citoplasmáticos y nucleares respectivamente y para controlar la pureza de cada fracción. Se detectaron los niveles de pERK como control de la activación de los oncogenes HRAS y BRAF. Se muestra un ensayo representativo de 3 experimentos independientes. **Panel D:** Se determinó la localización subcelular de βcatenina mediante inmunofluorescencia, utilizando un microscopio confocal con un objetivo de 63 aumentos. Se muestran una serie de fotografías representativas de 3 experimentos independientes en las que se observa la inmunodetección de βcatenina y su superposición con la tinción nuclear (DAPI).

Posteriormente analizamos si el aumento de la βcatenina en el núcleo se correlacionaba con un aumento de su actividad transcripcional. Para ello se transfectaron las células PC-HRAS y PC-BRAF con los promotores Top/Fop y se midió su activación tras inducir la expresión de HRAS y BRAF durante 24 y 48 horas, utilizando el Li como control positivo. Los resultados indicaron que la expresión de HRAS indujo una fuerte activación de los promotores dependientes de βcatenina/TCF que aumentó con el tiempo de expresión del oncogén (Fig 34 A). En el caso de BRAF solo se observó una ligera activación tras 48 horas de expresión de dicha proteína.

Con el objetivo de confirmar estos resultados co-transfectamos células HeLa con los vectores de expresión de HRAS^{V12} y BRAF^{V600E} y medimos la activación de los promotores Top/Fop. Los resultados indicaron que la expresión de HRAS activaba dichos promotores, mientras que la de BRAF no (Fig 34 B).

En conclusión estos resultados indican que la expresión del oncogén HRAS^{V12}, pero no la del BRAF^{V600E}, induce la inhibición de GSK3β hecho que correlaciona con un aumento en la expresión de βcatenina en el núcleo y un aumento de su actividad transcripcional.

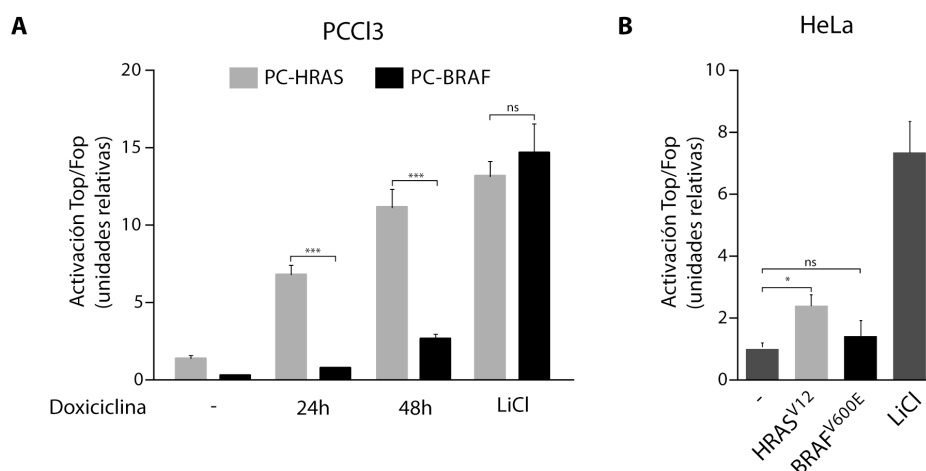


Fig.34-. Regulación de la actividad transcripcional de β catenina en respuesta a la expresión de HRASV12 y BRAFV600E. **Panel A:** Células PC-BRAF y PC-HRAS fueron transfectadas con 1,2 μ g de Super8xTopFlash o Super8xFopFlash y 50ng de pRL-CMV. Tras la transfección las células fueron cultivadas en medio basal durante 48h y a continuación fueron mantenidas en el mismo medio (-) o fueron tratadas con doxiciclina durante 24 y 48 h o con LiCl como control positivo durante 48h. Transcurrido este tiempo las células se recogieron para la determinación de la actividad luciferasa y renilla. **Panel B:** Células Hela fueron transfectadas con 1,2 μ g de Super8xTopFlash o Super8xFopFlash y 50ng de pRL-CMV y 0,5 μ g de los vectores de expresión de HRAS^{V12} y BRAF^{V600E} o el vector pcDNA3.1 como control. Tras la transfección fueron cultivadas en medio completo durante 48 horas y posteriormente se recogieron para la determinación de la actividad luciferasa y renilla. La actividad luciferasa se calculó como unidades de luz normalizadas con respecto a la actividad renilla generada a partir del vector pRL-CMV. La actividad β catenina/TCF específica se calculó obteniendo el ratio de las actividades de los promotores Top/Fop y es expresada de manera relativa como el número de veces de activación sobre los niveles (=1) de células transfectadas con el promotor Super8xFop. Los datos representan la media \pm S.D. (n=3) de una transfección representativa de 3 experimentos independientes. La significancia estadística de los datos se evaluó mediante un análisis t-test (two tailed). Las diferencias entre células las células PC-BRAF y PC-HRAS (**A**) o con respecto a las células transfectadas con el vector control (**B**) se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ (*), $p = 0,01$ a $0,001$ (**), $p < 0,001$ (***), ns: no significativas.

2.2-. La vía PI3K, pero no MAPK, regula la expresión de β catenina en células tumorales tiroideas humanas a través de su fosforilación en la serina 552

Para continuar con este estudio decidimos analizar el estatus de la vía Wnt/ β catenina en un panel de células tumorales tiroideas humanas que contenían las mutaciones de los genes más frecuentes encontrados en el cáncer de tiroides y que representaban los tres tipos de carcinoma de tiroides (papilar, folicular y anaplásico). Estas líneas celulares y sus mutaciones se resumen en la tabla 5.

Para llevar acabo este objetivo se analizó tanto la localización subcelular de β catenina como su actividad transcripcional. Como control positivo de la localización nuclear así como de la actividad transcripcional de β catenina utilizamos las células de carcinoma de colon HT29 que contienen una mutación en el gen APC inhibidor de la vía Wnt por lo que contienen esta vía constitutivamente activada. Como control negativo utilizamos las células epiteliales tiroideas humanas inmortalizadas NthyORI cuyo crecimiento es independiente de hormonas (TSH)(Lemoine, 1989).

Como se muestra en la figura 35 (ver paneles con asterisco blanco) la línea de carcinoma papilar BCPAP así como las líneas de carcinoma anaplásico 8505c, T238 y Cal62 expresaron β catenina exclusivamente en la membrana citoplasmática como las células NthyORI. Las líneas WRO y FRO (ver paneles asterisco naranja) procedentes de carcinoma folicular y anaplásico respectivamente, expresaron β catenina tanto en la membrana plasmática como en el citoplasma, presentando una

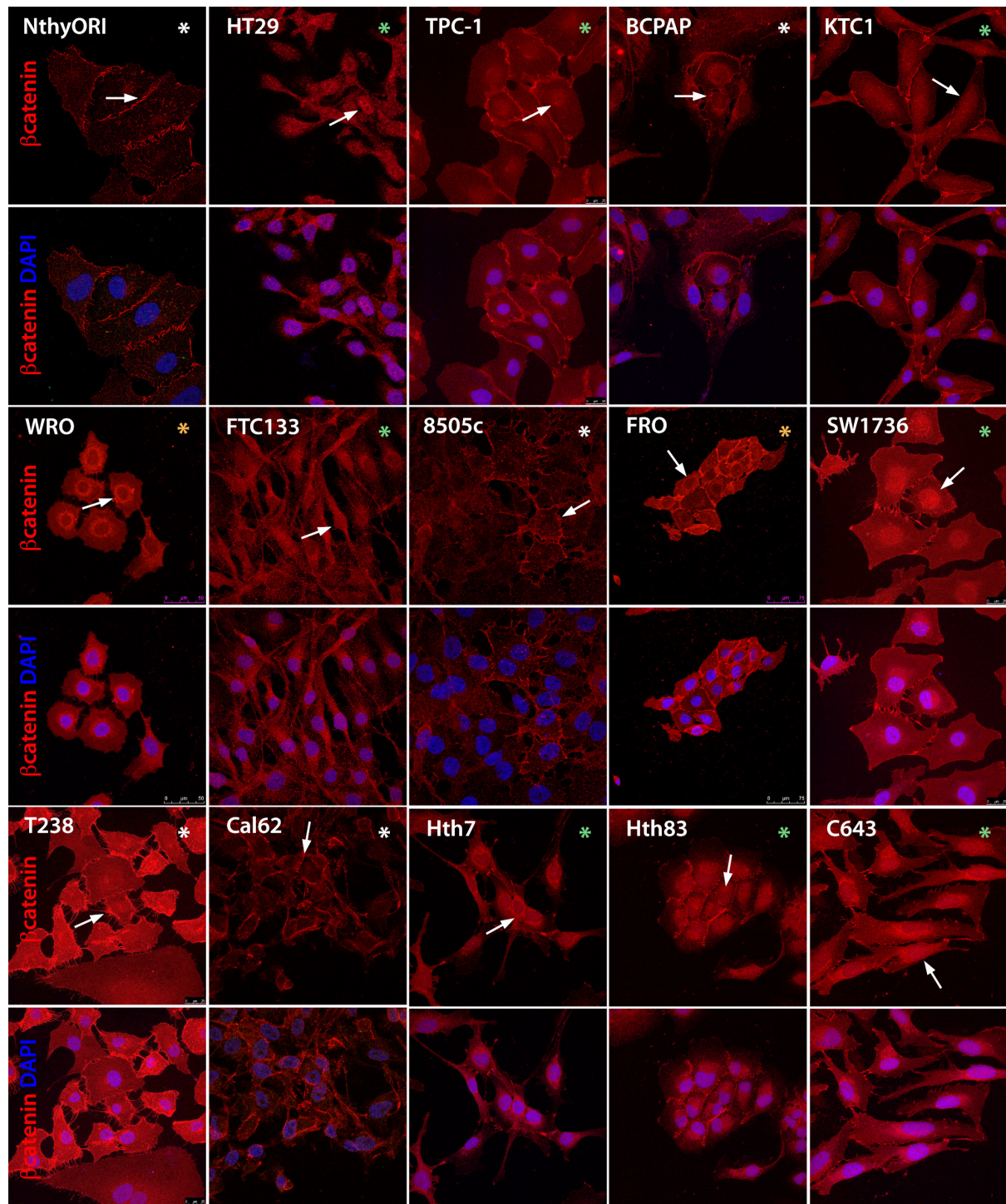


Fig.35-. Localización subcelular de β catenina en líneas celulares tumorales tiroideas humanas. Las líneas celulares indicadas fueron sembradas sobre cubreobjetos y cultivadas en medio completo durante 48 horas. A continuación fueron fijadas y se determinó la localización subcelular de β catenina mediante inmunofluorescencia, utilizando un microscopio confocal con un objetivo de 63 aumentos. Se muestran una serie de fotografías representativas de 3 experimentos independientes en las que se observa la inmunodetección de β catenina (flechas) y su superposición con la tinción nuclear (DAPI). Asteriscos blancos: indican las líneas celulares que expresan β catenina en la membrana plasmática. Asteriscos verdes: indican las líneas celulares que expresan β catenina en el núcleo. Asteriscos naranjas: indican las líneas celulares que expresan β catenina en la zona perinuclear.

acumulación llamativa en la región peri-nuclear. Por último las células de carcinoma papilar TPC1, las de carcinoma folicular FTC133, las de carcinoma papilar KTC1 y las de carcinoma anaplásico SW1736, Hth7, Hth83 y C643 (ver paneles con asterisco verde) expresaron β catenina en el núcleo.

Línea celular	Tipo carcinoma	Mutación descrita
HT29	Colon	APC
NthyORI	Control	-
TPC-1	CPT	RET/PTC
BCPAP		BRAF ^{V600E}
KTC1		BRAF ^{V600E}
FTC133	CFT	PTEN ^{ΔR130}
WRO		-
8505c		-
FRO	CAT	BRAF ^{V600E}
SW1736		-
T238		-
Cal62		KRAS ^{G12R +/-}
Hth7		NRAS
Hth83		NRAS
C643		HRAS
Hth74		-

Tabla.5-. Líneas celulares tumorales tiroideas humanas y las mutaciones descritas.

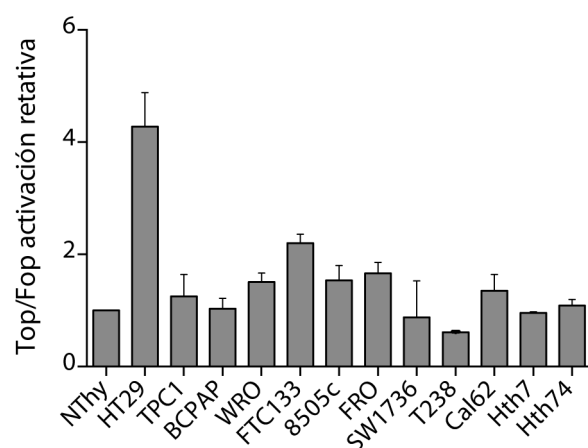


Fig.36-. Actividad transcripcional de β catenina en líneas celulares tumorales tiroideas humanas. Las líneas celulares, indicadas en la tabla 4, fueron transfectadas con 1,2 μ g de Super8xTopFlash o Super8xTopFlash y 50ng de pRL-CMV. Tras la transfección las células fueron cultivadas en medio completo durante 48h y posteriormente se recogieron para la determinación de la actividad luciferasa y renilla. La actividad luciferasa se calculó como unidades de luz normalizadas con respecto a la actividad renilla generada a partir del vector pRL-CMV. La actividad β catenina/TCF específica se calculó obteniendo el ratio de las actividades de los promotores Top/Fop y es expresada de manera relativa como el número de veces de activación sobre los niveles (=1) de células transfectadas con el promotor Super8xTopFlash. Los datos representan la media \pm S.D. (n=3) de una transfección representativa de 3 experimentos independientes.

Las células TPC1 contienen el reordenamiento RET/PTC, el cual se ha descrito que estabiliza β catenina aumentando su actividad transcripcional (Castellone, 2009), pero ni siquiera en estas células nosotros detectamos activación de los promotores Top/Fop. Sin embargo si que observamos una acumulación de β catenina en el núcleo comparable a la de las células TPC1 en las líneas Hth83, Hth7 y C643 que coincide con la presencia de mutaciones en Ras y en las células FTC133 que presentan funcionalmente inactivado PTEN. Por ello nos preguntamos si esta localización nuclear y la activación basal de la transcripción de β catenina podrían tener alguna relevancia funcional en estas líneas tumorales.

Para estudiar esta hipótesis decidimos utilizar las células FTC133 debido a que presentaban altos niveles de β catenina nuclear y a que fueron las células con mayor activación basal de los promotores Top/Fop.

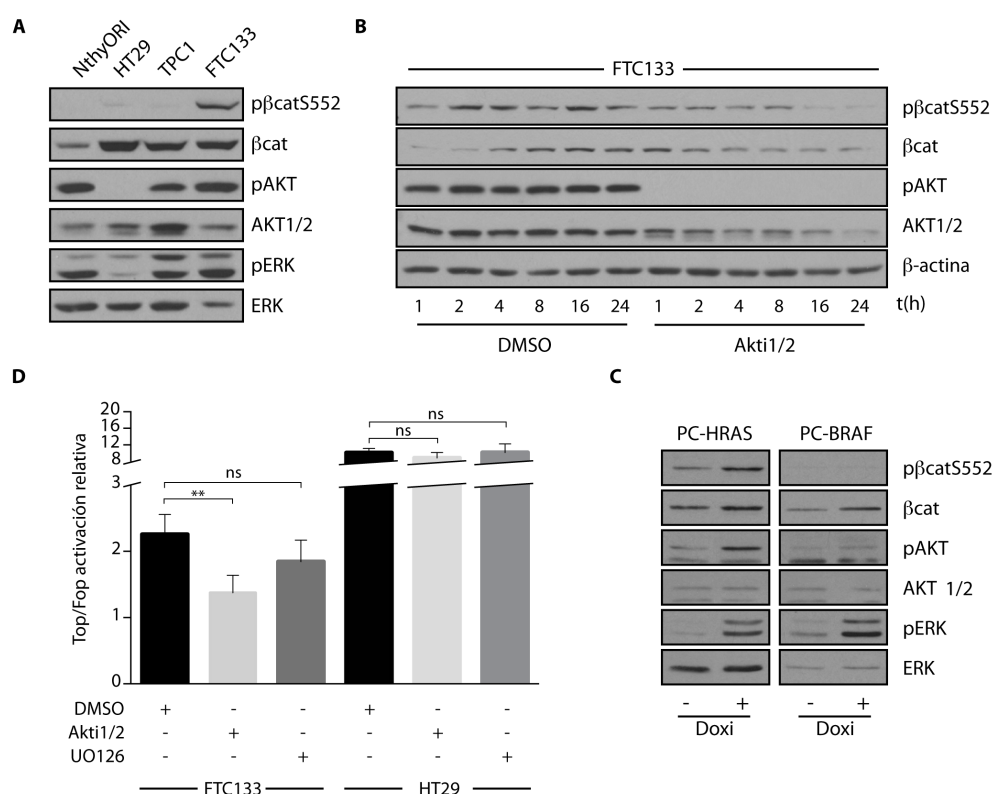


Fig.37-. Regulación de la expresión de βcatenina por AKT. Panel A: Las líneas celulares indicadas fueron cultivadas en medio completo durante 48h y a continuación recolectadas para analizar por Western-blot la expresión de pβcat S552, βcatenina, pAKT, pERK y AKT1/2 y ERK. **Panel B:** Células PC-HRAS y PC-BRAF fueron cultivadas en medio basal durante 48h y a continuación fueron mantenidas en el mismo medio (-) o tratadas con doxiciclina durante 48h. Tras el tratamiento fueron recolectadas para analizar por Western blot la expresión de pβcat S552 y βcatenina y de AKT1/2 y ERK. Además se detectó la expresión de pAKT y pERK como control de la actividad de los oncogenes HRAS y BRAF. **Panel C:** Células FTC133 fueron cultivadas en medio basal durante 12 horas y a continuación fueron tratadas con DMSO o Akti1/2 durante los tiempos indicados. Tras el tratamiento las células se recogieron para analizar por Western-blot la expresión de pβcat S552, βcatenina, AKT1/2 y β-actina como control de carga. Se analizó la expresión de pAKT como control de la eficiencia del inhibidor Akti1/2. **A, B y C:** Se muestra un Western-blot representativo de 3 experimentos independientes. **Panel D:** Células tiroideas FTC133 y de colon HT29 fueron transfectadas con con 0,3μg de Super8xTopFlash o Super8xFopFlash y 50ng de pRL-CMV. Tras la transfección las células fueron cultivadas en medio completo durante 12h y a continuación fueron tratadas con DMSO, Akti1/2 o UO126 durante 24h. Tras el tratamiento las células se recogieron para la determinación de la actividad luciferasa y renilla. La actividad luciferasa se calculó como unidades de luz normalizadas con respecto a la actividad renilla generada a partir del vector pRL-CMV. La actividad βcatenina/TCF específica se calculó obteniendo el ratio de las actividades de los promotores Top/Fop y es expresada de manera relativa como el número de veces de activación sobre los niveles (=1) de células transfectadas con el promotor Super8xFop. Los datos representan la media±S.D. (n=3) de una transfección representativa de 3 experimentos independientes.

En un primer análisis observamos que estas células expresaban niveles muy elevados de βcatenina, comparables a los de las células HT-29 y a las TPC-1 (Fig 37 A). Además esta βcatenina estaba fosforilada en la serina 552 específicamente en las células FTC133. Como se describió en el apartado anterior dicha fosforilación favorece la entrada de βcatenina al núcleo y por tanto su actividad transcripcional.

En células tiroideas diferenciadas esta fosforilación es mediada en respuesta a la TSH y al IGF1 a través de las quinasas PKA y Akt. Pero en las células tumorales la vía del cAMP/PKA se encuentra suprimida por la activación de oncogenes como HRAS (De Vita, 2005; Baratta, 2009). Teniendo en cuenta estos precedentes y puesto que las células FTC133 presentan una activación muy elevada de la vía PI3K/Akt nos planteamos estudiar si la βcatenina estaba siendo fosforilada y estabilizada a través de la actividad de las quinasas PI3K/Akt. Para comprobar esta hipótesis tratamos las células FTC133 con un inhibidor de Akt (Akti1/2) y analizamos la expresión de βcatenina fosforilada en el

residuo S552 a distintos tiempos de tratamiento con dicho inhibidor. Los resultados indicaron que tanto la fosforilación de β catenina como su expresión disminuyeron de forma dependiente del tiempo de inhibición de Akt, indicando que dicha quinasa estaba regulando la expresión de β catenina (Fig 37 B). Con el proposito de analizar si este hecho afectaba a la actividad transcripcional de β catenina, se midió la actividad Top/Fop de células FTC133 tratadas con los inhibidores de Akt y MEK. Como muestran los resultados la inhibición de Akt indujo una disminución de los niveles Top/Fop mientras que la de MEK no se alteró (Fig 37 C), indicando que la inhibición de Akt pero no de MEK afectaba a la actividad transcripcional de β catenina.

El oncogén BRAF activa la vía de las MAPK mientras que el HRAS activa ambas vías, MAPK y PI3K. Por ello quisimos analizar si la expresión del oncogén HRAS inducía la fosforilación de β catenina en las células PC-HRAS. Como se muestra en la figura 37 D, la expresión del oncogén HRAS, pero no de BRAF indujo la fosforilación de la β catenina. Estos datos reforzaban la implicación de la vía PI3K/Akt en la regulación de la β catenina. Con el fin de reforzar la confirmación de nuestra hipótesis, evaluamos la expresión de β catenina en respuesta Akt1/2 y UO126 dos inhibidores de Akt y MEK respectivamente, en las líneas celulares tumorales utilizadas anteriormente.

Como se muestra en la figura 38 tanto la fosforilación como la expresión de β catenina fueron dependientes de la actividad de Akt en las líneas Hth74, Hth7 y KTC-1. En las líneas C643 y SW1736 la expresión de β catenina fue dependiente de Akt, mientras que su fosforilación fue casi indetectable. Por último en la línea TCP1 de acuerdo con lo publicado (Cassinelli, 2009) la expresión de β catenina fue dependiente tanto de la actividad de Akt como de la de MEK.

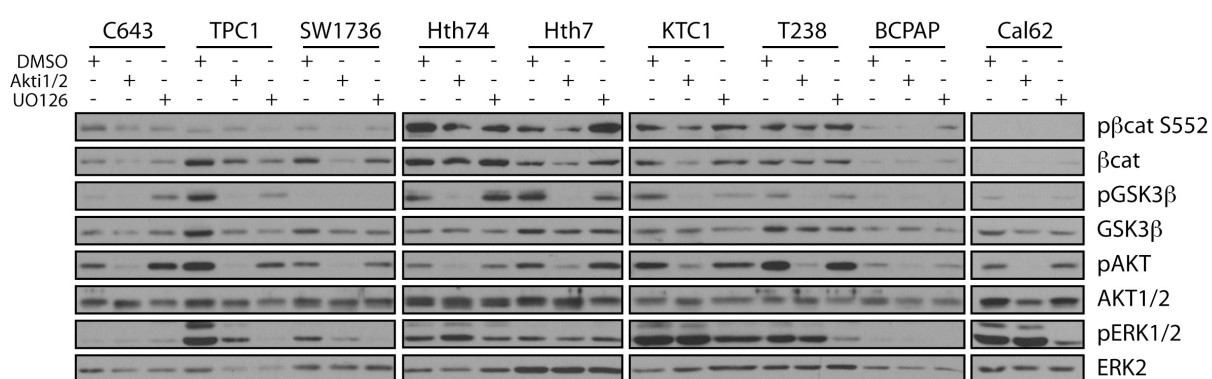


Fig.38-. Regulación de la expresión de β catenina por Akt y Mek. Las líneas celulares indicadas fueron cultivadas en medio basal durante 12h y a continuación fueron tratadas con DMSO, Akt1/2 o UO126 durante 24h. Tras el tratamiento las células se recogieron para analizar por Western-blot la expresión de pβcat S552, β catenina, pGSK3β, GSK3β, Akt1/2 y ERK. Se detectó la expresión de pAkt y pERK como control de la eficiencia de los inhibidores Akt1/2 y UO126. Se muestra un Western-blot representativo de 3 experimentos independientes.

En las líneas C643, Hth74, Hth7, KTC1, T238 y Cal62 la inhibición de Akt también disminuyó la fosforilación de GSK3β, mientras que la inhibición de Mek no, indicando que GSK3β se inhibe a través de Akt en estas líneas tumorales. Sin embargo en las células TPC1 la fosforilación de GSK3β fue dependiente de Akt y Mek como está publicado (Cassinelli, 2009).

Es de destacar que la expresión de β catenina fue regulada por Akt únicamente en aquellas células que expresaron β catenina en la fracción nuclear (TPC1, FTC133, KTC1, SW1736, C643, Hth74 y Hth7), mientras que en las células que expresaron β catenina en la membrana plasmática (T238, BCPAP y Cal62) no se observó dicha regulación.

Estos datos no solo confirman el papel de Akt en la estabilización de la β catenina, sino que sugieren que la vía de las MAPK no estaría implicada en dicho efecto. Este hecho concuerda con los resultados que habíamos obtenido en las células PC-HRAS y PC-BRAF. Esta estabilización estaría mediada por la fosforilación directa de β catenina en la S552, pero también a través de la inhibición de la GSK3 β .

2.3-. El silenciamiento de β catenina inhibe la síntesis de DNA a través de la inducción de senescencia en células tumorales tiroideas humanas

La expresión de β catenina en el citoplasma y en el núcleo de los distintos tipos de carcinoma de tiroides se ha relacionado con la expresión de su gen diana ciclinaD1 y con un mayor índice proliferativo (Garcia-Rostan, 2001). Dado que la vía PI3K/Akt es una de las vías más importantes en cáncer de tiroides y que como se ha demostrado en el apartado anterior, regula la expresión de la β catenina, nos planteamos investigar si la expresión de esta última tendría un papel relevante para la proliferación de las células tumorales tiroideas. Con el fin de estudiar esta hipótesis inhibimos la expresión de β catenina en células FTC133 mediante shRNA específicos y evaluamos su efecto sobre la proliferación.

Para ello infectamos células FTC133 con lentivirus que contenían un shRNA contra el mRNA de β catenina (sh β cat) o un shRNA control no codificante (shScramble) y realizamos ensayos de incorporación de BrdU como medida de la síntesis de DNA y la entrada en fase S del ciclo celular.

Como muestran los resultados la inhibición de la expresión de β catenina fue cercana a un 100% en comparación con las células control (Fig 39 A). Esta inhibición fue evidente 4 días después de la infección y además estable, ya que se mantuvo hasta los 30 días.

Los resultados de incorporación de BrdU mostraron que el silenciamiento de β catenina disminuyó en un 50% la síntesis de DNA en comparación con los controles (Fig 39 B) y esto coincidió con un descenso del crecimiento celular (Fig 39 C). Resultados similares se obtuvieron inhibiendo la expresión de β catenina en las líneas C643, Hth83, Hth7 y Hth74 (Fig 39 D).

Para asegurarnos de que este efecto era debido a las funciones de β catenina en transcripción y no en adherencia celular, generamos células FTC133 expresando de forma estable el dominante negativo de TCF4 anteriormente descrito. Los resultados mostraron una disminución significativa en la síntesis de DNA (Fig 39 B). En conjunto estos resultados indicaron que la β catenina a través de su interacción con TCF4 está implicada en la proliferación de las células FTC133.

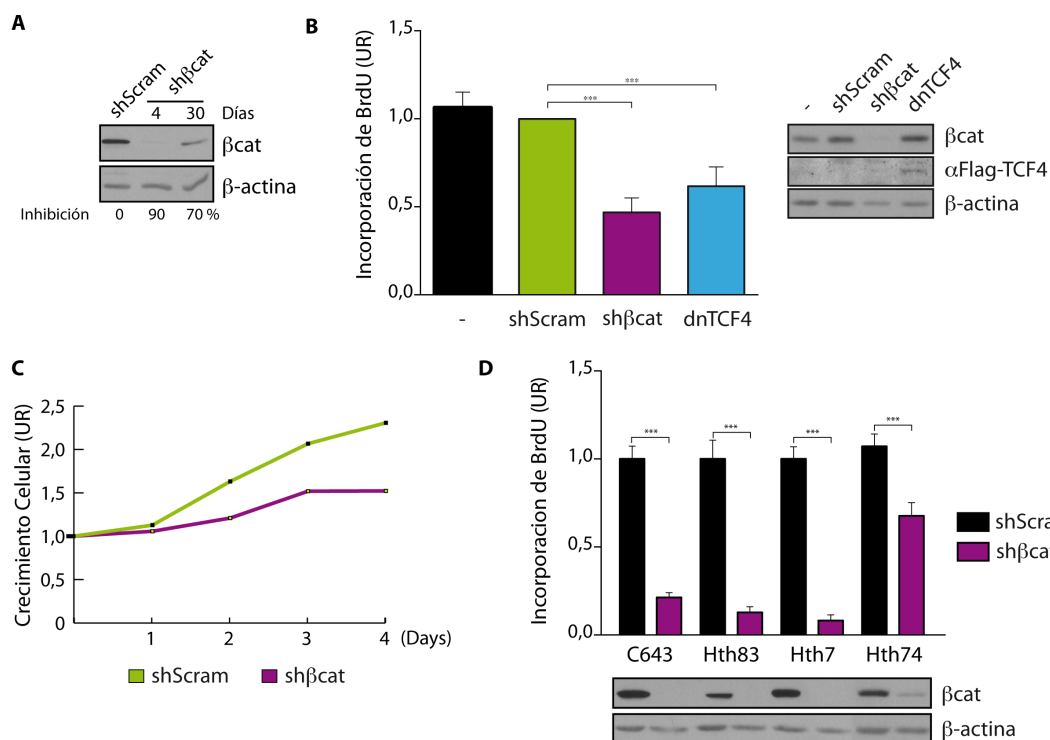


Fig.39-. Efecto del silenciamiento de βcatenina sobre la síntesis de DNA. **Panel A:** Células FTC133 fueron infectadas con los lentivirus shβcat y shScramble, seleccionadas con puromicina y a continuación cultivadas en medio completo durante 4 o 30 días. Posteriormente fueron recolectadas para la detección mediante Western-blot de βcatenina y β-actina como control de carga. Se indica el % de inhibición obtenido tras el tratamiento. **Panel B:** Células FTC133 sin infectar o infectadas con los lentivirus shscramble, shβcat y EdtP(Flag-dnTCF4) fueron cultivadas en medio completo durante 24h y tratadas con BrdU durante 2h más. A continuación fueron fijadas y tratadas para medir la incorporación de BrdU. En el **panel de la izquierda** se representan los resultados de incorporación de BrdU de manera relativa como el número de veces de incorporación sobre los niveles (=1) de células infectadas con el lentivirus shScramble. Los datos representan la media±S.E.M. de 3 experimentos independientes. En el **panel de la derecha** se muestra la expresión de βcatenina, αFlag como control de la interferencia de βcatenina y de la expresión del Flag-TCF4 y de β-actina como control de carga. **Panel C:** Se cultivaron células FTC133 infectadas con los lentivirus shscramble y shβcat en medio completo y se detuvo su crecimiento a los tiempos indicados. Se estimó el crecimiento celular como la densidad relativa de células de cada grupo experimental en el mismo periodo de tiempo(24h) a lo largo de 4 días. Cada punto representa la media±S.E.M. de 2 experimentos independientes realizados en duplicado. **Panel D:** Células C643, Hth83, Hth7 y Hth74 fueron infectadas con los lentivirus shScramble y shβcat y seleccionadas con puromicina. A continuación las células fueron cultivadas en medio completo durante 24h y tratadas con BrdU 2h más. Posteriormente fueron fijadas y tratadas para medir la incorporación de BrdU. Los resultados muestran la incorporación de BrdU de manera relativa como el número de veces de incorporación sobre los niveles (=1) de células infectadas con el lentivirus shScramble. En el **panel inferior** se muestra la expresión de βcatenina como control de su interferencia y la de β-actina como control de carga. Los datos representan la media±S.D. (n=8) un ensayo representativo de 3 experimentos independientes. La significancia estadística de los datos se evaluó mediante un análisis t-test (two tailed). Las diferencias con respecto a las células infectadas con el lentivirus shScramble se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ (*), $p = 0,01$ a $0,001$ (**); $p < 0,001$ (***); ns: no significativas.

Posteriormente analizamos la expresión de la ciclinaD1 en las células FTC133 silenciadas. En contra de lo esperado, la expresión de ciclinaD1 se encontraba elevada con respecto a los controles (Fig 40 A). Pero además la expresión de los inhibidores de ciclo celular p27^{KIP} también se encontraba elevada en las células silenciadas (Fig 40 A), lo que en parte explicaba la inhibición observada en la síntesis de DNA.

Los resultados obtenidos indicaban que el silenciamiento de βcatenina inducía una disminución de la proliferación pero también un aumento de la expresión de ciclinaD1 gen diana de βcatenina y proteína implicada en el ciclo celular. Estos datos contradictorios nos llevaron a tratar de entender que estaba ocurriendo. Tras una lectura exhaustiva de la bibliografía, planteamos como un posible efecto la inducción de senescencia. La senescencia es un proceso celular que se desencadena en

algunos casos en respuesta a distintos tipos de estrés celular y que induce una parada proliferativa estable. Esta parada proliferativa a nivel molecular se caracteriza por la sobre expresión de genes inhibidores del ciclo celular como p21^{Cip1}, p16^{INK4a}, p14^{ARF} o p27^{KIP} (Li, 1998), pero además en fibroblastos se ha relacionado con un aumento de la expresión de la ciclinaD1 (Fukami-Kobayashi, 1998; Burton, 2007).

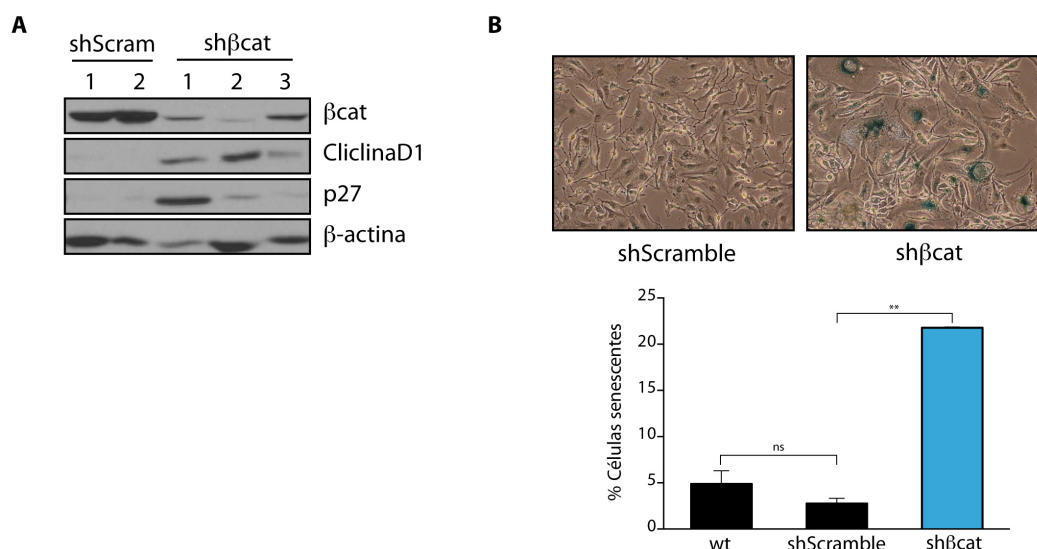


Fig-40-. Efecto del silenciamiento de βcatenina sobre el crecimiento de las células FTC133. Células FTC133 fueron infectadas con los lentivirus shβcat y shScramble, seleccionadas con puromicina y cultivadas en medio completo durante 4 días. Posteriormente las células fueron recolectadas para la detección mediante Western-blot de βcatenina, cilinaD1, p27 y β-actina como control de carga (**panel A**) o fueron fijadas para la posterior detección de la expresión de la β-gal-AS mediante tinción con X-gal (**panel B**). En el **panel superior** se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes y en el **panel inferior** el porcentaje de células β-gal-SA positivas como indicador del % de senescencia. La significancia estadística de los datos se evaluó mediante un análisis t-test (two tailed). Los cambios con respecto a las células infectadas con el lentivirus control fueron considerados significativos cuando p<0,05 (*), p=0,01 a 0,001 (**); p<0,001 (***); ns: no significativa.

Dado que éstas características eran las que ocurrían en las células en las que silenciamos la expresión de βcatenina, decidimos analizar si dichas células eran senescentes. Para ello evaluamos la expresión de la β-galactosidasa ácida asociada a senescencia (β-gal-SA) en las células FTC133 silenciadas y en sus controles. Como muestran los resultados la inhibición de la expresión de βcatenina indujo un aumento significativo del porcentaje de células β-gal-SA positivas en comparación con los controles (Fig 27 B), indicando que el silenciamiento de βcatenina promovía la senescencia en las células FCT133.

En conjunto estos resultados indican que βcatenina es importante para la proliferación de las células tumorales tiroideas, ya que la inhibición de su expresión promueve la parada proliferativa a través de la inducción de la senescencia.

2.4-. El silenciamiento de la β catenina induce la expresión de la E-cadherina en células FTC133 a través de la represión de la expresión de factores de transcripción de EMT e inhibe la invasión celular

Los cambios moleculares que capacitan a las células tumorales para migrar e invadir de forma local o larga distancia tejidos fuera del tumor primario se engloban en un proceso conocido como transición epitelio-mesénquima (EMT). Dicho proceso conlleva cambios en la expresión génica que van a promover la pérdida del fenotipo epitelial y la adquisición de uno mesenquimal. Este fenotipo puede ser inducido en respuesta a factores secretables como TGF β , EGF o factores Wnt entre otros (Peinado, 2007). Uno de los primeros eventos que caracterizan la EMT es la pérdida de la expresión de la cadherina epitelial o E-cadherina. La inhibición de la expresión de dicho gen es llevada a cabo por varios factores de transcripción como β catenina/TCF, Snail, Slug, TWIST o ZEB1/2 a través de la unión a secuencias específicas en su promotor.

La inhibición de la expresión de E-cadherina es un evento que tiene lugar durante el proceso de tumorigénesis tiroidea. En nuestro laboratorio se ha descrito que BRAF a través de la secreción de TGF β o de la activación de las MAPK inhibe la expresión de E-cadherina (Riesco-Eizaguirre, 2009; Knauf, 2011). Pero no se han descrito los mecanismos implicados en la represión de E-cadherina en tumores que contienen una sobre-activación de la vía PI3K/Akt. Como hemos demostrado la vía PI3K regula la expresión de β catenina, una de las proteínas responsables de la inhibición de E-cadherina. Por ello nos propusimos estudiar el papel de β catenina en la regulación de E-cadherina.

El análisis de la expresión de E-cadherina en células FTC133 en las que se había silenciado la expresión de β catenina mostró que se encontraba elevada tanto a nivel de RNA como de proteína en comparación con sus controles (Fig 41 A y B) indicando que la β catenina estaba implicada en la represión de E-cadherina en las células FTC133.

Además de reprimir la expresión de E-cadherina los complejos β catenina/TCF promueven la EMT a través de la expresión de los factores de transcripción *Slug* y *TWIST* (Howe, 2003; Sakai, 2005). Por ello analizamos la expresión de dichos factores transcripción. Como muestran los resultados su expresión se encontraba reducida en las células sin β catenina (Fig 41 B). En consecuencia también se encontró disminuida la expresión de los genes de EMT, de *N-cadherina* y *ZEB1*, genes diana de TWIST y Slug respectivamente (Alexander, 2006; Wels, 2011).

Además la expresión del factor de transcripción *Snail* también se encontró disminuida en las células sin β catenina pese a que no es diana directa de los complejos β catenina/TCF. Por el contrario la expresión de otros genes mesenquimales como *Fibronectina* o *Vimentina* no se encontró alterada por la inhibición de la expresión de β catenina.

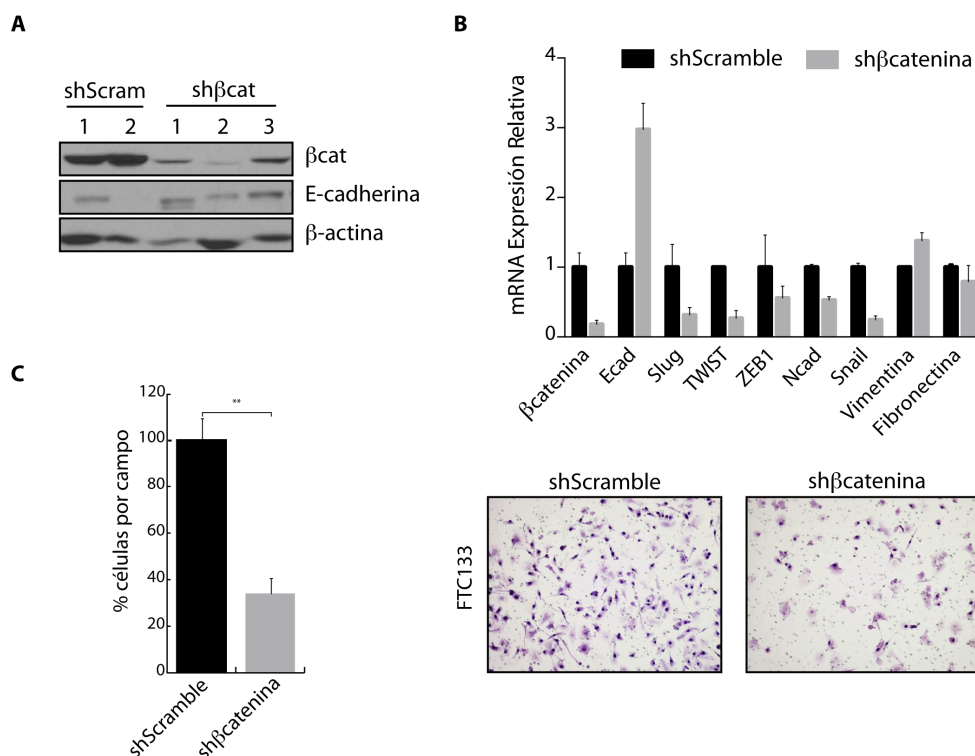


Fig.41-. Efecto del silenciamiento de βcatenina sobre la EMT y la capacidad invasiva. Células FTC133 fueron infectadas con los lentivirus shβcat y shScramble, seleccionadas con puromicina y a continuación fueron cultivadas en medio completo durante 4 días. Posteriormente las células fueron recolectadas para la detección mediante Western-blot de βcatenina, E-cadherina y β-actina como control de carga (**Panel A**) o para la extracción de RNA total (**panel B**). El RNA fue retro-transcrito para la posterior detección mediante QPCR de los niveles de mRNA de E-cadherina, Slug, TWIST, Zeb1, N-cadherina, Snail, Vimentina, Fibronectina y βcatenina relativos a la expresión de la β-actina. **Panel C.** Células FTC133 shScramble y shβcat fueron sometidas al ensayo de invasividad utilizando transwells cubiertos con matrigel durante 22 horas. El **gráfico de la izquierda** muestra el porcentaje de células que invaden con respecto al control (100%). Las **fotografías de la derecha** muestran un campo representativo de cada línea celular. Se muestra la media±S.D. de un ensayo realizado por duplicado. La significancia estadística de los datos se evaluó mediante un análisis t-test (two tailed). Los cambios con respecto a las células infectadas con el lentivirus control fueron considerados significativos cuando $p < 0,05$ (*), $p = 0,01$ a $0,001$ (**).

El proceso de EMT capacita a las células tumorales para migrar e invadir los tejidos adyacentes. Para determinar como el silenciamiento de βcatenina afectaba la capacidad de invadir de las células FTC133, realizamos ensayos de invasividad en matrigel utilizando un sistema de transwell. Como muestran los resultados el silenciamiento de la expresión de βcatenina inhibió la invasividad de las células FTC133 en comparación con las células control (shScramble), como indica la reducción del número de células que invaden (Fig 41 C).

Estos resultados indicaban que la βcatenina participa en la regulación de la transición Epitelio-Mesénquima a través de la regulación de los factores de transcripción Slug y TWIST y promoviendo un cambio de expresión de cadherinas que contribuye a la capacidad invasiva de las células tumorales tiroideas.

2.5- El silenciamiento de la βcatenina reduce el crecimiento tumoral de las células FTC133

Finalmente analizamos la implicación de la βcatenina en el crecimiento tumoral. Para ello silenciamos de nuevo la expresión de βcatenina en las células FTC133 utilizando los lentivirus

sh β cat y las inyectamos en el flanco de ratones inmuno-comprometidos NOD-SCID utilizando como control células FTC133 infectadas con el lentivirus shscramble.

Debido al lento crecimiento de las células FTC133 silenciadas no nos fue posible obtener grandes grupos experimentales por lo que los resultados obtenidos no son estadísticamente significativos a falta de aumentar el número de ratones en el ensayo. Pese a esto, los resultados preliminares muestran una drástica reducción del volumen del tumor en las células FTC133 silenciadas cuando las comparamos con sus controles (Fig 42 A). Para comprobar si la expresión de β catenina continuaba inhibida en los tumores sh β catenina, se analizó mediante inmunofluorescencia la presencia de dicha proteína. Como se muestra en la figura 42 B, la expresión de β catenina se encuentra muy reducida en los tumores sh β catenina en comparación con los controles.

Estos resultados son muy prometedores y a falta de ser confirmados, indicarían que la β catenina es imprescindible para el crecimiento tumoral de las células FTC133.

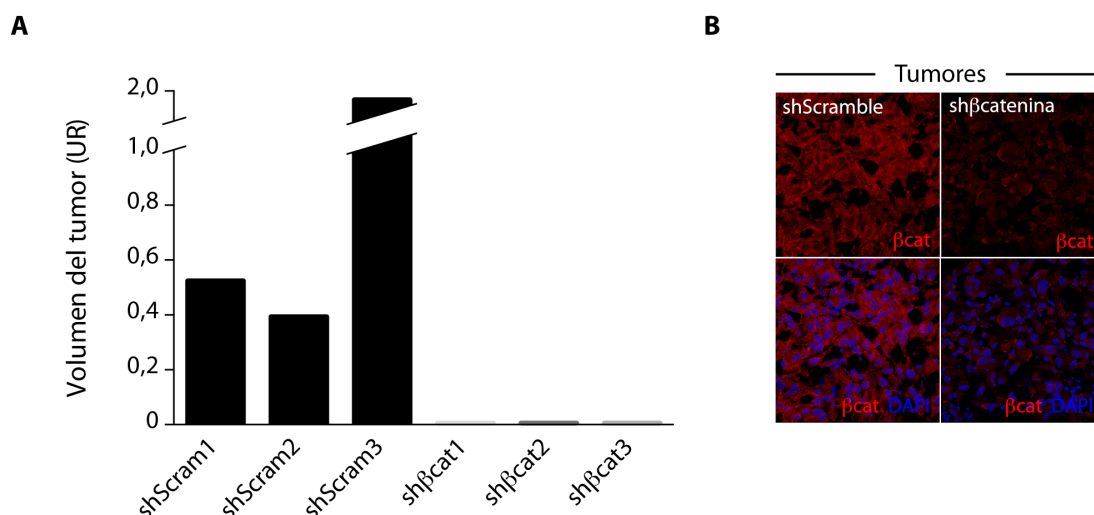


Fig.42-. Efecto del silenciamiento de la expresión de β catenina sobre el crecimiento tumoral. Células FTC133 fueron infectadas con los lentivirus sh β catenina y shScramble, seleccionadas con puromicina y a continuación fueron cultivadas en medio completo durante 4 días. Posteriormente fueron inyectadas en el flanco de ratones NOD-SCID y tras dos meses extrajeron los tumores y se midió su volumen (mm³). **Panel A:** Se representa el volumen de 3 tumores obtenidos. **Panel B:** Detección de la expresión de β catenina mediante inmunofluorescencia en los tumores shScramble y sh β catenina, utilizando un microscopio confocal con un objetivo de 40 aumentos. Se muestran una serie de fotografías representativas en las que se observa la inmunodetección de β catenina y su superposición con la tinción nuclear (DAPI).

Discusión



Funciones Wnt-independientes de la β catenina en la proliferación y diferenciación de la glándula tiroidea

TSH e IGF1 regulan la localización y actividad transcripcional de la β catenina

Los factores Wnt regulan procesos tan distintos como son la proliferación, diferenciación, migración y polaridad celular tanto en el desarrollo embrionario como en los tejidos adultos y su alteración se ha relacionado con procesos patológicos como el cáncer. Esta diversidad funcional se debe a que dichos factores pueden activar 3 vías de señalización diferentes, que van a producir efectos totalmente distintos sobre la célula. Así a través de la activación de la vía canónica o Wnt/ β catenina, estos factores regulan la proliferación y diferenciación celular, mientras que la activación de las vías no canónicas o Wnt/ Ca^{2+} y PCP regulan procesos relacionados con la migración y la polaridad celular. La vía mejor estudiada hasta el momento y en la que nos hemos centrado en este trabajo es la vía canónica cuya activación lleva a la acumulación de la proteína β catenina en el núcleo.

Durante el desarrollo embrionario la vía Wnt/ β catenina es fundamental para el establecimiento del eje antero-posterior y la diferenciación del mesodermo del embrión (Haegel, 1995; Huelsken, 2000; Morkel, 2003). Así los ratones knock out para factores Wnt como Wnt1 o para el gen *Ctnnb1* (que codifica para la proteína β catenina) son letales embrionarios debido a que sufren graves defectos durante la gastrulación. Además la generación de ratones knock out condicionales ha permitido estudiar el efecto de la pérdida de la función de esta vía en tejidos específicos y se ha descrito que es necesaria para el correcto desarrollo del sistema nervioso, riñón y las extremidades entre otros (Soshnikova, 2003; Zechner, 2003; Park, 2007).

En los tejidos adultos la función de la vía canónica es la de mantener la homeostasis tisular. En los tejidos Wnt-dependientes como el epitelio del intestino y el folículo piloso (Wong, 1998; DasGupta, 1999) dicha vía regula la activación y proliferación de las células madre y la posterior diferenciación de las células derivadas de estas (Merrill, 2001; Pinto, 2003). Así la vía canónica mantiene el tamaño e identidad de algunos tejidos regulando su proliferación y diferenciación.

El evento clave que promueve la activación de esta vía es la acumulación en el núcleo de la proteína β catenina. Como hemos explicado en detalle en la introducción el mecanismo de activación de esta ruta implica la desestabilización del llamado “complejo de destrucción” de β catenina. En este complejo las quinasas CKI y GSK3 β fosforilan de forma secuencial a la β catenina en el extremo c terminal, lo que promoverá que sea reconocida y ubiquitinada por la ubiquitin ligasa β -Trcp y a continuación degradada por el proteasoma. Por lo tanto la desestabilización de dicho complejo impide la fosforilación de β catenina y en consecuencia su degradación, de forma

que la proteína β catenina sintetizada *de novo* quedará estabilizada en la fracción citoplasmática y nuclear de las células sobre las que actúan los factores Wnt. En este trabajo hemos descrito un novedoso mecanismo de estabilización de β catenina de manera independiente de los factores Wnt, a través de modificaciones postraduccionales inducidas por la hormona TSH y el factor de crecimiento IGF1 en las células tiroideas. La TSH y el IGF1 a través de la activación de las vías de la PKA y de la PI3K/Akt van a fosforilar a GSK3 β en la ser 9 y a β catenina en las serinas 552 y 675 favoreciendo la estabilización de esta última y aumentando su actividad transcripcional (Fig 43).

Lo poco que se conoce del papel de estas fosforilaciones sobre la función de la β catenina se ha descrito en sistemas heterólogos (Tian, 2004; Hino, 2005; Taurin, 2006; Fang, 2007) pero cada día están cobrando más relevancia sobre todo en situaciones patológicas como el cáncer (Kobielak, 2007; Guturi, 2012; Zhu, 2012). En este trabajo describimos la regulación de β catenina en respuesta a dos estímulos fisiológicos, la TSH y el IGF1, y su papel en la proliferación de las células tiroideas normales.

Varios trabajos han demostrado que la PKA induce la fosforilación de β catenina en la S675 aunque los efectos sobre su estabilidad varían. Algunos trabajos indican que dicha fosforilación inhibe su ubiquitinación y degradación (Hino, 2005) mientras que otros no (Taurin, 2006), pero la β catenina fosforilada en este residuo tiene una mayor capacidad transcripcional ya que favorece su unión a la histona acetil transferasa CBP (Taurin, 2006). *In vivo* el trabajo realizado por van Veelen et al. demuestra que dicha fosforilación se favorece cuando β catenina ha sido previamente fosforilada en la Y654 (van Veelen, 2011). Esta última fosforilación debilita la unión de β catenina con las cadherinas e induce su localización en el citoplasma donde posteriormente será fosforilada por PKA. En cuanto a la fosforilación en la S552 se sabe que es sustrato de PKA pero se conoce poco acerca de su papel (Taurin, 2006). La fosforilación en este residuo se ha relacionado más con la activación de la vía PI3K, ya que también es sustrato de Akt (Tian, 2004; Fang, 2007). Varios trabajos han descrito que la fosforilación de β catenina se induce en un contexto tumoral en respuesta a factores de crecimiento como HGF o EGF a través de la activación de Akt (Fang, 2007; Kobielak, 2007; Vermeulen, 2010). Dicha fosforilación va a debilitar la unión de β catenina con las cadherinas y a favorecer su interacción con la proteína 14-3-3 ζ que a su vez la translocará al núcleo donde además β catenina tiene una mayor actividad transcripcional (Tian, 2004; Fang, 2007).

Como hemos descrito en las células tiroideas, en estado de quiescencia, la β catenina se localiza en las uniones adherentes. En este trabajo describimos como la estimulación fisiológica con hormona la TSH y el factor de crecimiento IGF1 regulan la localización de β catenina y su actividad transcripcional a través de su fosforilación en los residuos que acabamos de describir. TSH induce la fosforilación de β catenina en los residuos de S552 y 675 a través de la activación de la quinasa PKA. A su vez, IGF1 induce la fosforilación de β catenina en la S552 de forma dependiente de la activación

de Akt. La inducción de estas fosforilaciones coinciden con un rápido aumento de la β catenina en el citoplasma y núcleo de las células tiroideas detectable a los 15 minutos de estimulación con TSH o IGF1 (datos no mostrados) que también es dependiente de la activación de las vías de la PKA y de la PI3K.

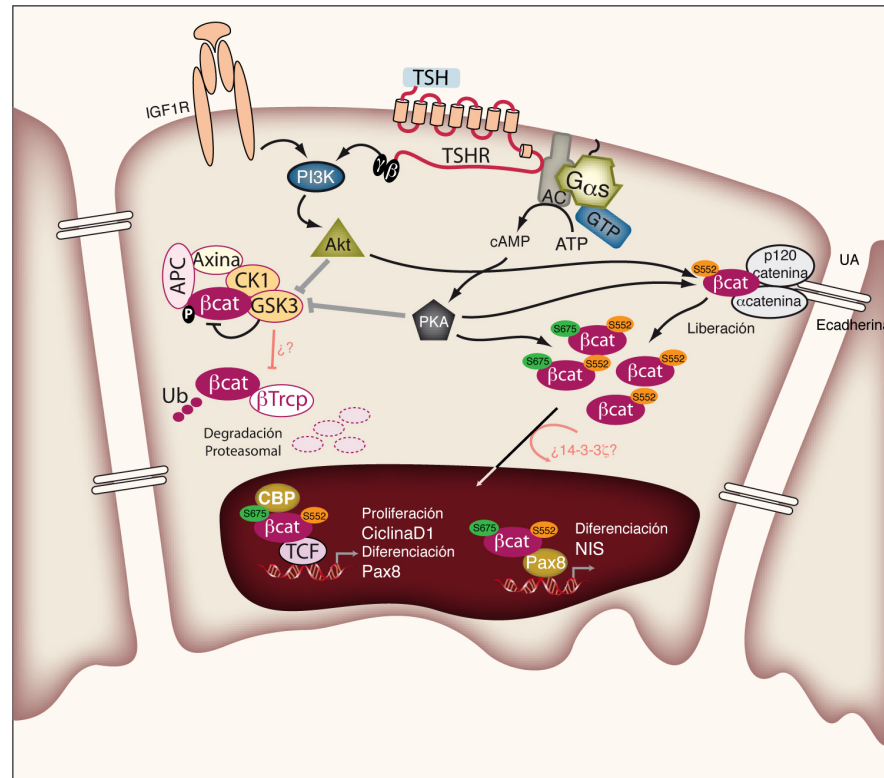


Fig 43-. Representación esquemática de la regulación de β catenina por la TSH y el IGF1 y de los procesos regulados por la β catenina en células tiroideas diferenciadas. La TSH a través de la activación de la PKA y Akt, y el IGF1 activando Akt, inhiben a la GSK3 β . Simultáneamente la activación de PKA por TSH y la de Akt por IGF1 induce la fosforilación de la β catenina en la S552 que se encuentra localizada en las uniones adherentes, debilitando su interacción con las cadherinas y favoreciendo su localización en el citoplasma. En el citoplasma PKA la fosforilará en la S675 y posteriormente será transportada al núcleo por mecanismos aun desconocidos pero, que pueden implicar a la proteína 14-3-3 ζ . En el núcleo β catenina interacciona y aumenta la actividad transcripcional de los factores de transcripción TCF, activando la expresión de genes relacionados con proliferación (ciclinaD1) y o con diferenciación (Pax8), o del factor de transcripción Pax8, activando la expresión de genes de diferenciación como NIS. Las flechas indican activación y las líneas truncadas inhibición.

En línea con la observación de que la β catenina se acumulaba en el citoplasma de las células tiroideas, encontramos que GSK3 β se estaba inhibiendo en respuesta a TSH e IGF1. GSK3 β es uno de los reguladores negativos de β catenina y tanto la TSH como el IGF1 inducían su inhibición a través de su fosforilación en la serina 9 de forma dependiente de las quinasas PKA y PI3K/Akt. Diferentes estudios habían relacionado la inhibición de la quinasa GSK3 β con un aumento de la proliferación de las células tiroideas (Tasevski, 2000; Chen, 2010). Nuestros resultados apoyan esta idea ya que GSK3 β es inhibida en respuesta a los dos principales estímulos proliferativos de dichas células. Pese a que TSH e IGF1 inhiben a GSK3 β los niveles de expresión de β catenina no varían en respuesta a estos estímulos. Estudiamos las fosforilaciones de β catenina en el extremo N-terminal para comprobar si la inhibición de GSK3 β afectaba a la estabilidad de β catenina y no detectamos variación en las fosforilaciones mediadas por GSK3 β . Sin embargo si detectamos un aumento en la

fosforilación mediada por CK1 en la S45, tanto en respuesta a TSH como a Forskolina, que no se correlacionaba con una disminución de la proteína total. Algunos trabajos han sugerido que PKA fosforila a β catenina en la S45 sin afectar a la estabilidad de la proteína (Kang, 2002; Hino, 2005) pero son necesarios más estudios para evaluar su función.

La acumulación en el núcleo de β catenina finalmente resulta en la activación transcripcional de los promotores dependientes de β catenina/TCF. La activación de los promotores Top/Fop no fue muy elevada pero si reproducible y similar a la inducida por el factor Wnt3A en las líneas celulares utilizadas. Esta evidencia indicaba que es una activación fisiológica y no patológica como la que ocurre en las células tumorales y suficiente para ejercer un efecto proliferativo como discutiremos más adelante. El hecho de que no hayamos podido detectar la expresión de ningunos de los Wnt activadores de la vía canónica en nuestro sistema celular y de que no detectemos un aumento de los niveles totales de β catenina nos lleva a pensar que se trata de un mecanismo independiente de factores Wnt, aunque son necesarios más estudios para confirmar esta hipótesis. Para ello en próximos ensayos analizaremos el efecto de la expresión de inhibidores de los factores Wnt como DKK1 o SFRP sobre la acumulación de β catenina en el núcleo en respuesta a TSH e IGF1.

Con estos datos proponemos un mecanismo mediante el cual la TSH y el IGF1 fosforilarían a β catenina en la S552 liberándola de las uniones adherentes. Posteriormente se acumularía en el citoplasma donde no sería degradada porque GSK3 β se encuentra inhibida y podría ser fosforilada en otros residuos como la S675 y finalmente se translocaría al núcleo donde activará la expresión de sus genes diana (Fig 43). Los datos obtenidos utilizando cultivos primarios de tirocitos de ratón indicarían que este mecanismo está conservado en un modelo más fisiológico, ya que la forskolina es capaz de inducir la fosforilación de β catenina y su localización nuclear, datos que reforzarían nuestra hipótesis inicial. Como ya comentamos en los resultados, estas células pierden la expresión del TSHR por lo que no pudimos evaluar el efecto de la TSH. La expresión del TSHR no esta regulada por la propia TSH (Medina, 2000b) por lo que es posible que necesite alguna otra señal secretada de forma paracrina por las células parafoliculares. Y por último los ratones hipotiroideos que expresan altos niveles de TSH en sangre, tienen niveles elevados de β catenina en el citoplasma y núcleo de las células foliculares indicando que *in vivo* TSH también regula la localización de β catenina.

Estos resultados en parte son contrarios a lo descrito en el trabajo de Kim et al en el que proponen que la TSH regula la expresión de Wnt1 y éste aumenta la proliferación de las células tiroideas a través de la activación de vías no canónicas (Kim, 2007). Nosotros no detectamos la expresión de Wnt1 en las células PCCl3 ni en las FRTL5 (utilizadas en el trabajo mencionado)(Fig 13 y datos no mostrados). Además Wnt1 es típicamente un activador de la vía canónica. No descartamos la implicación de las vías no canónicas en la regulación de las células tiroideas, ya que hemos detectado niveles muy elevados de expresión de factores Wnt no canónicos como Wnt4, Wnt5A o Wnt11 (Fig 13) y su expresión se encuentra alterada en cáncer de tiroides (Kremenevskaja, 2005; De

Menna, 2012), pero se necesitan más estudios para entender su función. En aquel trabajo también estudiaron los niveles de β catenina en respuesta a TSH, observando que los niveles totales no varían, pero si que disminuye la β catenina no fosforilada en los residuos diana de CK1 y GSK3 β (β catenina activa). Estos datos concuerdan con los nuestros, ya que vemos un aumento de β catenina fosforilada en la S45 en respuesta a TSH e IGF1, pero aquí además hemos analizado la localización de β catenina, observando que aumenta en el núcleo en respuesta a ambos ligandos.

Implicación de la β catenina en la proliferación inducida por TSH e IGF1

El conocimiento de las vías de señalización y mecanismos moleculares implicados en la regulación de la proliferación de las células tiroideas nos puede ayudar a comprender lo que ocurre durante el proceso de transformación celular, ya que muchas de estas vías de señalización están activadas de forma aberrante en los tumores de tiroides. La TSH y el IGF1 regulan la proliferación de las células tiroideas adultas induciendo la entrada en la fase G1 del ciclo celular y la transición G1/S (Burikhanov, 1996). Hasta el momento se han implicado diversas vías de señalización como la vía de la PKA (Medina, 2000c), la PI3K (Saito, 2001), MAPK (Burikhanov, 1996) y mTOR (Blancquaert, 2010) en dicha respuesta proliferativa, siendo las dos primeras rutas las mejor descritas y las que parecen tener mayor relevancia en una situación fisiológica. Además diversos trabajos *in vitro* e *in vivo* han demostrado que es necesaria la estimulación conjunta con TSH e IGF1 para que haya una síntesis de DNA eficiente y las células tiroideas proliferen correctamente.

La transición G1/S se induce a través de la activación de la expresión de los genes de ciclo celular ciclinaD1 y D3 (Tramontano, 1986a; Isozaki, 1987; Pirson, 1996; Lewis, 2004; Fukushima, 2008). La expresión de dichos genes es imprescindible para inducir posteriormente la expresión de los genes responsables de la síntesis de DNA y por tanto de la replicación del mismo, por ello es importante conocer los mecanismos que lo regulan. En este trabajo demostramos que la β catenina está implicada en la expresión de su gen diana ciclinaD1 (He, 1998; Tetsu, 1999) en respuesta a TSH e IGF1 y en la proliferación inducida por estos factores. Previamente habíamos demostrado que la β catenina se estabiliza en el citoplasma y núcleo de las células tiroideas en respuesta a TSH e IGF1 y lo hace a tiempos muy cortos de estimulación y de forma dependiente de la PKA y de la PI3K/Akt. Mediante ensayos de pérdida y ganancia de función hemos demostrado que β catenina es uno de los factores que regula la expresión de ciclinaD1 en respuesta a estos ligandos en las células tiroideas. El silenciamiento de la expresión de β catenina mediante el uso de shRNA lentivirales redujo la expresión de ciclinaD1 en respuesta a TSH e IGF1 y en consecuencia la síntesis de DNA como se ha demostrado mediante ensayos de incorporación de BrdU. Este efecto ocurre a través de la interacción con los factores de transcripción TCF, ya que la sobre-expresión de un dominante negativo de TCF4 también redujo la expresión de ciclinaD1 en respuesta a ambos estímulos. Por el

contrario la sobre-expresión de una β catenina resistente a la degradación proteasomal indujo la expresión de la ciclinaD1 aun en ausencia de TSH e IGF1, confirmando que ciclinaD1 es un gen diana de la β catenina en nuestro sistema celular.

En conjunto estos datos indican que la β catenina se acumula en el núcleo en respuesta a TSH e IGF1 donde posteriormente va a activar la expresión del gen de ciclo celular ciclinaD1 mediando así la señal proliferativa inducida por la TSH y el IGF1. Estos resultados sitúan a la β catenina como un efector común de la vía de la PKA y de la PI3K/Akt y añaden un novedoso mecanismo de regulación de la proliferación de las células tiroideas. Además los resultados descritos recientemente en nuestro laboratorio añaden otro nuevo factor FoxO1 a la regulación hormonal de la proliferación de los tirocitos (Zaballos, 2013). Este es un factor de transcripción que actúa como un gen supresor tumoral ya que inhibe la proliferación celular mediante la regulación de genes como el inhibidor de ciclo p27 (Medema, 2000). Se expresa en los núcleo de las células tiroideas en estado de quiescencia y mediante la activación de PI3K/Akt en respuesta a TSH e IGF1, FoxO1 es translocado al citoplasma donde posteriormente es degradado por el proteasoma.

Estos resultados junto con los descritos en este trabajo nos permiten proponer un modelo mediante el cual la TSH y el IGF1 activando la vía de la PKA y de la PI3K respectivamente fosforilan a β catenina liberándola de las uniones adherentes acumulándose en el núcleo donde se unirá a los factores de transcripción TCF activando la expresión de genes pro-proliferativos. Por otro lado los mismos ligandos activando la vía de la PI3K inducen la fosforilación y exclusión del núcleo de FoxO1 dejándose de expresar genes inhibidores de la progresión del ciclo celular como p27. En conjunto estos datos aportan nuevos conocimientos sobre los mecanismos implicados en la regulación fisiológica de la proliferación de las células tiroideas y nos permite hacernos una idea de los mecanismos que participan en la carcinogénesis tiroidea donde estas rutas están activadas de forma aberrante.

Los adenomas tóxicos son lesiones benignas que se desarrollan por la activación aberrante de la vía AC-cAMP inducidas por la aparición de mutaciones activadores en el TSHR o en las proteínas G α s. Sería interesante analizar la expresión de β catenina en estos tumores, ya que dichas lesiones contienen una hiperactivación de la vía AC-cAMP-PKA y un aumento en la proliferación que correlaciona con la expresión de ciclinaD1 (Saiz, 2002).

Implicación de la β catenina en la diferenciación de las células tiroideas

Para que la glándula tiroidea sea funcional y sintetice y secrete HT de forma correcta, las células foliculares deben de expresar las denominadas proteínas de diferenciación tiroidea que son el TSHR, NIS, TPO y Tg. La expresión de estos genes está regulada por los factores de transcripción tiroideos Pax8, Nkx2-1 y FoxE1. Estos se comienzan a expresar en el día 8.5 del desarrollo embrionario de ratón en respuesta a estímulos aun sin identificar, pero de forma independiente de

hormonas ya que el receptor de TSH y la propia TSH no se comienza a expresar hasta el día E14 y 15.5 respectivamente (Lazzaro, 1991; Postiglione, 2002). A partir del día 15.5 la regulación de los FT tiroideos pasa a ser dependiente de la TSH. Se ha descrito que dicha hormona regula la expresión de estos FT a través de la activación del factor de transcripción CREB (Nguyen, 2000) pero existen muchas lagunas acerca de esta regulación ya que el ratón KO del receptor de TSH continua expresando los FT tiroideos (De Felice, 2004), por lo que se ha sugerido la implicación de otras señales en la regulación de dichos FT. Sin embargo la expresión de los genes de diferenciación NIS y TPO es completamente dependiente de la presencia de TSH (De Felice, 2004). En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de la regulación del factor de transcripción Pax8. Durante el desarrollo embrionario Pax8 está involucrado en la proliferación y supervivencia de los progenitores tiroideos (Mansouri, 1998). En el tiroides adulto datos de nuestro laboratorio han demostrado que Pax8 también es importante para la proliferación tiroidea (Rossi, 1995) y recientemente en el congreso europeo de tiroides se han confirmado estos datos (Di Palma, 2012) y se han presentado evidencias de que también juega un papel en la supervivencia y diferenciación tiroidea (Di Palma, 2012; Marotta, 2012). Su relevante papel en diferenciación se debe a que es necesario para la expresión del factor de transcripción FoxE1 y de los genes de TPO, Tg y NIS (Pasca di Magliano, 2000). Pese a la importancia de este factor de transcripción no se conocen las señales que lo regulan durante el desarrollo embrionario, ni los mecanismos implicados en su regulación por TSH.

Pax8 se expresa en otros tejidos como el riñón en el que la vía Wnt/ β catenina tiene un papel importante para su desarrollo ya que activa la expresión de varias proteínas de diferenciación entre las que se encuentra Pax8 (Park, 2007; Schmidt-Ott, 2007). En este trabajo presentamos evidencias de que la β catenina también regula la expresión de Pax8 en las células tiroideas. Mediante experimentos de pérdida de expresión de β catenina hemos demostrado que dicha proteína es necesaria para la expresión de Pax8 y parte de esta regulación la media interaccionando con los factores de transcripción de la familia TCF. Por otro lado los resultados obtenidos sobre-expresando el mutante de β catenina resistente a la degradación han demostrado que activa la expresión de Pax8 aun en ausencia de TSH reforzando nuestros resultados. Además con el fin de ahondar en la regulación de Pax8, clonamos distintos fragmentos de su región promotora, en la que previamente habíamos identificado *in silico* sitios de unión para distintos factores de transcripción. Realizando co-transfecciones transitorias con el vector de expresión de β catenina, demostramos que el promotor de Pax8 contiene al menos 3 sitios putativos de unión de TCF y que son funcionales por que se activan en respuesta a β catenina. En estudios futuros demostraremos la interacción *in vivo* de β catenina con el promotor de Pax8 en células tiroideas mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

Estos resultados indican que la β catenina regula la expresión de Pax8 en células tiroideas. Como ya hemos mencionado no se conocen las señales que activan la expresión de Pax8 durante el desarrollo embrionario y se ha sugerido que vías de señalización como la Shh, FGF o Wnt podrían estar regulando este proceso (De Felice, 2011). Los resultados presentados indican que la β catenina activa la expresión de Pax8, por lo que la vía Wnt canónica podría estar regulando a este gen también durante el desarrollo embrionario. Hasta ahora no se ha estudiado el efecto del silenciamiento de β catenina durante el desarrollo de la glándula tiroidea. El único trabajo que describe algo al respecto menciona que el ratón KO de β catenina o Wnt2 (uno de los Wnt canónicos) no presenta defectos en la expresión de Nkx2-1 en el esbozo tiroideo en el día E9.5 del desarrollo embrionario, pero no analizan la expresión de Pax8 (Goss, 2009). En los experimentos de silenciamiento de β catenina no detectamos diferencias en la expresión de Nkx2-1 (datos no mostrados), por lo que en nuestro sistema experimental este gen no es diana de β catenina. Si esto ocurriera también *in vivo* (en ratón), los resultados presentados en dicho trabajo (Goss, 2009) no descartarían que la expresión de Pax8 pudiese estar afectada. En estudios futuros analizaremos si la vía Wnt/ β catenina participa en el desarrollo embrionario del tiroides. Para llevar a cabo este proyecto hemos obtenido embriones del ratón transgénico Top-gal (DasGupta, 1999). Dicho ratón expresa el gen testigo de la β galactosidasa bajo el control del promotor dependiente de los complejos β catenina/TCF, Top, de forma que los tejidos en los que la vía Wnt esté activada serán positivos a la tinción con X-gal. Para distinguir si la vía canónica está implicada en la especificación del esbozo tiroideo o en la fase proliferativa que se da posteriormente, analizaremos embriones de E7.5 y E8.5 o embriones de E14.5 respectivamente. Los datos presentados en este trabajo, junto con los futuros experimentos nos ayudarán a entender el papel de la vía Wnt canónica en el tiroides y aclarará si esta vía es importante durante el desarrollo embrionario.

En el estudio del promotor de Pax8 también describimos sitios de unión funcionales de los factores de transcripción CREB, Nkx2-1 y del propio Pax8. Hasta el momento se había descrito que la expresión de Pax8 se activaba en respuesta a TSH y se proponía que era a través del factor de transcripción CREB, pero no se había identificado la secuencia de unión de este FT (Medina, 2000b). Los resultados obtenidos indican que existe un sitio CRE localizado en el promotor basal de Pax8 que se activa cuando transfectamos el vector de expresión de CREB. Mediante ensayos de mutagénesis confirmaremos la funcionalidad de este sitio de unión. Estos resultados explicarían la activación de la expresión de Pax8 en respuesta a la TSH. También identificamos en dicho promotor un sitio de unión funcional de Pax8 y Nkx2-1. Hasta ahora se había descrito que Nkx2-1 regula la expresión de Pax8 durante el desarrollo embrionario a través de un enhancer situado en el extremo 5' del gen de Pax8 (Parlato, 2004; Nitsch, 2010). Además se había propuesto la existencia de un bucle positivo de regulación de Pax8 en el que este FT se uniría a su propio promotor activando su expresión, pero no se había identificado dicha secuencia. En el trabajo de Ruiz-

Llorente et al., mediante ChIP-Seq describimos que Pax8 se une a una secuencia localizada en su promotor basal. En dicho trabajo se obtuvo una secuencia consenso de unión de Pax8, mediante la cual pudimos identificar el sitio al que se unía Pax8 que coincidía con la secuencia encontrada en el ChIP-seq (Ruiz-Llorente, 2012).

Mediante ensayos de transfección transitoria con los vectores de expresión de Pax8 y Nkx2-1 hemos confirmado la funcionalidad de estos sitios, describiendo la activación sinérgica del promotor de Pax8 cuando se co-transfectan los dos FT. Durante la realización de esta tesis el grupo de Di Lauro publicó un trabajo en que identificaron la misma secuencia de unión de Pax8 (Di Gennaro, 2012), describiendo su funcionalidad y la unión *in vivo*, mediante ChIP, de Pax8 a su propio promotor. En esta tesis además de describir el sitio de unión de Pax8, caracterizamos nuevos sitios de unión para los factores CREB, Nkx2-1 y TCF, profundizando en la regulación del promotor de Pax8. En conjunto los resultados presentados junto a los descritos previamente en el grupo de di Lauro (Nitsch, 2010; Di Gennaro, 2012) tienen una gran relevancia a nivel fisiológico ya que en parte explicaría por que Pax8 y los otros FT se continúan expresando aun en ausencia de TSH o de su receptor.

La expresión de Nkx2-1 parece ser independiente de TSH en la glándula tiroidea adulta, por lo que este FT podría estar activando la expresión de Pax8 aún en ausencia de TSH y este último estaría activando su propia expresión y la de FoxE1 ((Di Palma, 2011) y datos sin publicar de nuestro laboratorio). Pero por el contrario los genes tiroideos NIS y TPO precisarían de la TSH y de la vía de señalización AC-cAMP-PKA activada por la unión a su receptor. Esta situación se podría extrapolar a lo que ocurre durante el desarrollo embrionario para mantener la expresión de estos FT, pero aun quedarían por identificar las señales que inician su expresión.

β catenina actúa como activador transcripcional de Pax8

La β catenina se une a factores de transcripción aumentando su actividad transcripcional sobre los promotores de los genes que regulan. En la vía Wnt canónica actúa uniéndose a los factores de transcripción de la familia TCF/LEF, activando los genes diana de dicha vía de señalización. Pero cada día se describen nuevos FT a los que activa, como los receptores de hormonas tiroideas, FOXO, Oct4 o Sox17 (Sinner, 2004; Essers, 2005; Shah, 2006; Kelly, 2011). De esta manera la β catenina activa la expresión de genes no relacionados con la vía canónica.

En este trabajo hemos descrito como la β catenina actúa como un activador transcripcional del factor de transcripción Pax8. β catenina aumenta la actividad de Pax8 sobre un promotor artificial de respuesta a Pax8, sobre el promotor de su gen diana NIS o sobre su propio promotor, pero además también es capaz de aumentar la activación de estos promotores en respuesta a la TSH o a la Forskolina. Confirmamos esta cooperación mediante ensayos de inmunoprecipitación y

demostramos que Pax8 y β catenina interactúan físicamente en el núcleo de las células tiroideas. Sería interesante estudiar mediante mutagénesis dirigida como la fosforilación de β catenina en respuesta a TSH e IGF1 pueden modificar o no la interacción con Pax8 o su actividad transcripcional. Estos resultados indicarían que la β catenina además de actuar a través de su interacción con TCF, mediaría la señal de la TSH a través de su interacción con Pax8. Pero esta cooperación también sucede en ausencia de TSH indicando que puede ser independiente de la activación de la PKA. Esta novedosa interacción podría tener gran relevancia no solo en la glándula tiroidea, sino también en otros órganos como el riñón, en el que la vía Wnt está implicada en desarrollo y homeostasis tisular y que expresa altos niveles de Pax8 (Schmidt-Ott, 2007).

Se ha detectado la expresión de Pax8 en muchos tumores de distintos orígenes (Ozcan, 2011) y varios trabajos sugieren que puede tener un papel en la carcinogénesis (Li, 2011), ya que se ha relacionado con la proliferación de las células tumorales. Es más, en carcinoma de tiroides, Pax8 se expresa en todos los tipos de tumores incluidos los carcinomas anaplásicos (Nonaka, 2008). Sería interesante establecer una correlación entre los tumores que expresan Pax8 y aquellos que presentan alteraciones que llevan a la acumulación de β catenina en el núcleo con el objetivo de estudiar su posible interacción.

Papel de β catenina en la carcinogénesis tiroidea. Conexión entre las vías PI3K/Akt y Wnt/ β catenina

En los carcinomas de tiroides malignos se ha propuesto un modelo por el que la alteración de la vía PI3K/Akt lleva a la aparición de carcinomas foliculares (CFT) y la de la vía de las MAPK a la de carcinomas papilares (CPT) (Fig 8 y 9). Posteriormente alteraciones *de novo* en genes como TP53 o CTNNB1 favorecerían la progresión hacia las formas más agresivas, los carcinomas pobremente diferenciados y anaplásicos. Esta hipótesis ha sido reforzada por múltiples estudios genéticos que describen que las mutaciones en la vía PI3K/Akt son mucho más frecuentes en CFT que en CPT (Ringel, 2001), mientras que sucede lo contrario con las mutaciones activadoras de las MAPK que solo se encuentran en CPT (Kimura, 2003; Nikiforova, 2003). En los últimos años se han incrementado los estudios sobre las alteraciones genéticas de la vía PI3K/Akt, ya que se ha descrito que muchos carcinomas pobremente diferenciados y anaplásicos portan este tipo de mutaciones aun cuando derivan de carcinomas papilares (Garcia-Rostan, 2005; Hou, 2007; Abubaker, 2008; Liu, 2008; Santarpia, 2008).

En conjunto estos estudios proporcionan una fuerte base genética y han llevado a postular un modelo en el que la activación de la vía PI3K/Akt estaría asociada con la progresión tumoral, de manera que los tumores foliculares y papilares diferenciados precisan de segundas alteraciones

genéticas que activen dicha vía para progresar hacia tumores pobremente diferenciados o anaplásicos (tema ampliamente revisado en (Xing 2010)). Además en muchos de estos trabajos se han relacionado estas alteraciones genéticas con la fosforilación de Akt, sugiriendo que funcionan como activadoras de la vía PI3K/Akt (Vasko, 2004).

La vía PTEN/PI3K/Akt regula procesos celulares fundamentales ligados a la tumorigénesis como son la progresión en el ciclo celular, supervivencia celular, adhesión, motilidad y migración celular y angiogénesis. Dada su importancia en la progresión tumoral, sería de gran utilidad conocer las moléculas que median la señal de Akt, con el propósito de descubrir nuevas dianas terapéuticas que puedan ser moduladas en carcinomas que hasta ahora no son tratables como los carcinomas altamente metastáticos o los CAT. En este trabajo hemos descrito como la expresión de β catenina es dependiente de la actividad de Akt en líneas tumorales humanas derivadas de distintos tipos de carcinomas. Además la β catenina tiene un papel relevante porque la inhibición de su expresión promueve una disminución de la proliferación, invasividad y crecimiento tumoral y una inhibición de la expresión de genes mesenquimales lo que sugiere que se está induciendo una transición mesenquima-epitelio.

Hasta el momento se había asociado la alteración de la vía Wnt solo con carcinomas pobremente diferenciados y anaplásicos, en los que mutaciones en los genes de la β catenina o axina promueven la activación constitutiva de esta vía (Garcia-Rostan, 1999; Garcia-Rostan, 2001). En carcinomas diferenciados no se han detectado mutaciones de β catenina o de ningún otro componente de la vía canónica, pero se ha descrito que la localización de β catenina disminuye en la membrana y aparece en el citoplasma en el 60-100% de los CPT y CFT (Ishigaki, 2002; Meirmanov, 2003; Rezk, 2004; Zhang, 2011). Hasta hace unos años este hecho se había asociado a la pérdida de la expresión de E-cadherina dado que este evento ocurre con frecuencia en los carcinomas diferenciados. Pero publicaciones recientes han descrito como la activación del receptor RET por el reordenamiento RET/PTC en CPT (Cassinelli, 2009; Castellone, 2009; Tartari, 2011) o incluso en carcinomas medulares (Gujral, 2008) (derivados de las células parafoliculares del tiroides) promueve la estabilización de β catenina en el citoplasma y núcleo de células tumorales tiroideas humanas y de rata. La activación de RET induce la fosforilación de β catenina en los residuos de tirosina Y654 e Y142 que es mediada por el propio receptor RET o por el receptor MET respectivamente. Estas fosforilaciones van a debilitar la unión de β catenina con las cadherinas y favorecen su localización en el citoplasma y núcleo, donde β catenina regulará genes asociados con proliferación como la ciclinaD1.

Estos resultados estarían de acuerdo con lo descrito anteriormente ya que se había relacionado la localización citoplasmática de β catenina con la expresión de su gen diana ciclinaD1 y con un mayor índice proliferativo. Pero como ya se ha comentado los reordenamientos RET/PTC supondrían solo un 20% de los CPT.

En este trabajo describimos la regulación y el papel funcional de la β catenina en líneas celulares que contienen mutaciones en genes como BRAF y H, N y KRAS así como deleciones en PTEN, que representan las alteraciones genéticas más frecuentes en el carcinoma de tiroides. Nuestros resultados demuestran un papel diferencial de la vía de las MAPK y la PI3K/Akt en la regulación de β catenina. Utilizando las células PC-BRAF y PC-HRAS demostramos que la expresión del oncogén HRAS pero no de BRAF inducía la acumulación en el núcleo de β catenina y un aumento en su actividad transcripcional a través de la inhibición de GSK3 β . Además realizando la aproximación inversa analizamos la expresión de β catenina en respuesta a inhibidores de la vía de las MAPK o PI3K. Para ello utilizamos un amplio panel de líneas celulares derivadas de tumores tiroideos humanos que incluían CFT, CPT y CAT y que contenían las distintas alteraciones genéticas descritas en cáncer de tiroides.

Analizando estas líneas celulares establecimos una clara correlación entre la localización nuclear de β catenina y la dependencia de PI3K/Akt para su expresión, pero no de MAPK. De forma que la expresión de β catenina fue dependiente de Akt solo en las líneas celulares que expresaron β catenina en el núcleo. Estos datos confirmaban los obtenidos en las células PC-HRAS y PC-BRAF ya que HRAS activa la PI3K mientras que BRAF no lo hace. La expresión de β catenina está regulada a través de la inhibición de GSK3 β y su localización en el citoplasma y núcleo inducida por la fosforilación de β catenina en la S552, que como hemos mencionado anteriormente, debilita su interacción con las cadherinas. Se ha descrito que la fosforilación de la β catenina en la S552 aumenta su interacción con la proteína 14-3-3 ζ y que esta última la transporta al núcleo donde tendría una mayor actividad transcripcional que la proteína no fosforilada (Tian, 2004; Fang, 2007). Además varios trabajos han asociado la expresión de β catenina en el núcleo en tumores, con la de la proteína 14-3-3 ζ (Kobiela, 2007) y en tumores tiroideos un estudio muy reciente (Sofiadis, 2012) ha descrito que algunas proteínas 14-3-3, entre las que se encuentra la 14-3-3 ζ , están sobre-expresadas en carcinomas foliculares y papilares de tiroides. En trabajos futuros estudiaremos la expresión de dicha proteína en las líneas de cáncer de tiroides humano, su posible interacción con β catenina y si esta última es dependiente de Akt. Además sería de gran interés analizar la expresión de 14-3-3 ζ en tumores de tiroides humanos y correlacionar su localización sub-celular con la de pAkt y p β catenina respectivamente, con el fin de confirmar que este mecanismo se produce en tumores humanos y que puede estar implicado en la transformación de las células tiroideas.

Al analizar la actividad transcripcional de β catenina encontramos que ninguna de las líneas analizadas tenía una alta activación de los promotores Top/Fop. Este hecho nos sirvió para descartar que las líneas utilizadas presentaran mutaciones activadoras de la vía canónica ya que la presencia de dichas mutaciones induce una activación mucho mayor de estos promotores (10 veces o más). A pesar de ello los resultados preliminares obtenidos indican que esta activación basal es

dependiente de la actividad de Akt y no de MEK lo que nos llevó a evaluar si dicha activación era suficiente para que β catenina estuviera regulando alguna función celular. Mediante ensayos de pérdida de función hallamos que β catenina es importante para la síntesis de DNA y crecimiento de dichas líneas tumorales ya que su silenciamiento indujo una parada proliferativa estable. Además estos efectos eran mediados a través de la interacción con los TCF.

Al analizar la expresión de ciclinaD1, gen diana de β catenina, encontramos que estaba elevada en las células silenciadas, pese a que los inhibidores del ciclo celular p27 o p21 también lo estaban (ver Fig 27 A y datos no mostrados). Estos resultados contradictorios nos hicieron investigar que fenómeno podía estar sucediendo. Se ha descrito en fibroblastos, que la senescencia replicativa se caracteriza por el aumento de la expresión de varios inhibidores de ciclo celular pero también de la ciclinaD1 (Fukami-Kobayashi, 1998; Berardi, 2003; Burton, 2007). Mediante la detección de SA- β -gal confirmamos que el silenciamiento de β catenina promovía un aumento del porcentaje de células positivas para SA- β -gal y por tanto de células senescentes. Se ha descrito que β catenina puede favorecer el “escape” de senescencia inducida por oncogenes como RAS (Delmas, 2007) o favorecer la proliferación de células con mutaciones en p53 (Damalas, 2001). Además la inhibición de la vía Wnt canónica induce la senescencia en otros tipos celulares a través de la activación de GSK3 β (Ye, 2007) y esta actúa favoreciendo la formación de los complejos de heterocromatina facultativa implicados en la inducción de la senescencia (Ye, 2007). De forma que los factores Wnt retrasarían la senescencia a través de la inhibición de GSK3 β y de la estabilización de β catenina.

A la luz de estos datos y de nuestros resultados podríamos especular que la activación de la vía PI3K/Akt podría mimetizar a la activación de la vía Wnt canónica. Así Akt inhibiría a la quinasa GSK3 β y estabilizaría la β catenina, que estaría favoreciendo la proliferación de estas células tumorales. En consecuencia el silenciamiento de la expresión de β catenina provocaría la inducción de la senescencia a través de la sobre-expresión de p27 y p21. Curiosamente la inhibición de la vía PI3K también promueve un fenotipo de parada de ciclo celular semejante a la senescencia que es mediado por la sobre-expresión de p27 (Collado, 2000).

Tanto en nuestro laboratorio, como en otro grupo, se ha descrito que el oncogén BRAF induce la EMT a través de la estimulación de la secreción de TGF β y de la activación de factores de transcripción de la familia Smad (Riesco-Eizaguirre, 2009; Knauf, 2011), pero se conoce poco acerca de la regulación de la EMT por la activación de PI3K/Akt en cáncer de tiroides. Sin embargo existen muchas evidencias de la regulación de la EMT por los factores Wnt canónicos y los complejos β catenina/TCF. Este complejo activa la expresión de los FT mesenquimales *Slug* y *TWIST* (Howe, 2003; Sakai, 2005) y estos a su vez regulan la expresión del factor de transcripción *ZEB1* y de *N-cadherina* característica de EMT (Alexander, 2006; Wels, 2011). Estos FT junto con el complejo β catenina/TCF reprimen la expresión de E-cadherina que es uno de los eventos que inicia la EMT y

que provocará que se debiliten las uniones adherentes y que las células migren desde el tumor primario. Además en el carcinosarcoma uterino la activación de la vía PI3K/Akt promueve la EMT aumentando la estabilización de β catenina y con ello la expresión de *Slug* (Saegusa, 2009).

Con estos antecedentes analizamos el papel de β catenina en la transición epitelio mesenquima. Nuestros resultados muestran que el silenciamiento de la expresión de β catenina induce una disminución de los niveles de los FT *Slug*, *ZEB1*, *TWIST* y *Snail* y en consecuencia un aumento de la expresión de la E-cadherina, y por el contrario la disminución de la expresión de la cadherina mesenquimal, N-cadherina. Estos datos confirmaban la implicación de β catenina en la inducción de EMT, pero la expresión de otros genes mesenquimales como *fibronectina* y *vimentina* no se vió afectada, lo que es consistente con la existencia de una regulación de la EMT mediada por PI3K/Akt pero independiente de β catenina. En línea con estos resultados la disminución en los marcadores de EMT tras el silenciamiento de la expresión de β catenina resultó en una disminución de la capacidad invasiva de las células tumorales.

Por último analizamos el papel de β catenina en el crecimiento tumoral y encontramos que el silenciamiento de dicho gen lo inhibía completamente, hecho que es debido a la inducción de senescencia celular como demostramos previamente. Sería de gran utilidad desarrollar un modelo inducible de expresión del shRNA de β catenina con el fin de poder estudiar *in vivo* el papel su inhibición sobre el tamaño tumoral. Además en un futuro confirmaremos si el crecimiento de estos tumores es dependiente de la actividad transcripcional de la β catenina midiendo el crecimiento tumoral de células expresando un dominante negativo de TCF4.

Las metástasis son la principal causa de muerte de los pacientes con CPT y CFT más agresivos. Por ello sería interesante analizar como el silenciamiento de β catenina o la expresión del dnTCF4 interfieren con la aparición de metástasis linfáticas o a distancia. Para ello hemos puesto apunto un modelo ortotópico de cáncer de tiroides (previamente descrito en (Todaro, 2010)) en el cual, mediante cirugía implantamos células tumorales en la glándula tiroidea. Estas células generan un tumor primario en el tiroides que es capaz de invadir localmente y de dar metástasis tanto linfáticas como a distancia en el pulmón, reproduciendo el fenotipo de los carcinomas de tiroides humanos. Este modelo nos será de gran utilidad para analizar el comportamiento de las células en las que hemos suprimido la vía Wnt canónica, pero también supondrá un buen modelo para testar distintos tipos de inhibidores.

Los estudios sobre la participación de la vía Wnt en carcinomas anaplásicos con mutaciones en Axina o β catenina, aquellos otros sobre la interacción de RET-PTC con β catenina en carcinoma papilar y los datos que aportamos en este trabajo convierten a la β catenina en una posible diana terapéutica para tratar el carcinoma de tiroides.

La vía Wnt canónica está implicada en la transformación de un gran número de tumores, lo que ha llevado a varios grupos a la búsqueda y desarrollo de inhibidores específicos de esta vía de señalización. Estos actúan aumentando la estabilidad del complejo de degradación de β catenina con el fin de disminuir los niveles de β catenina en el citoplasma o núcleo (Huang, 2009), o interfiriendo con la interacción entre β catenina y los TCF o el co-activador p300 (Lepourcelet, 2004; Henderson, 2010), inhibiendo la transcripción de genes relacionados con el ciclo celular. El desarrollo de estos inhibidores podría contribuir al tratamiento de los carcinomas de tiroides, especialmente el de aquellos con alta actividad de la vía PI3K/Akt o con mutaciones activadores de la vía Wnt.

En resumen, nuestros resultados sugieren un papel importante de la ruta canónica de la β catenina en la proliferación, crecimiento tumoral e invasividad de las células tumorales tiroideas con activación aberrante de la vía PI3K/Akt y abren una posible vía terapéutica para el tratamiento de estos tumores.

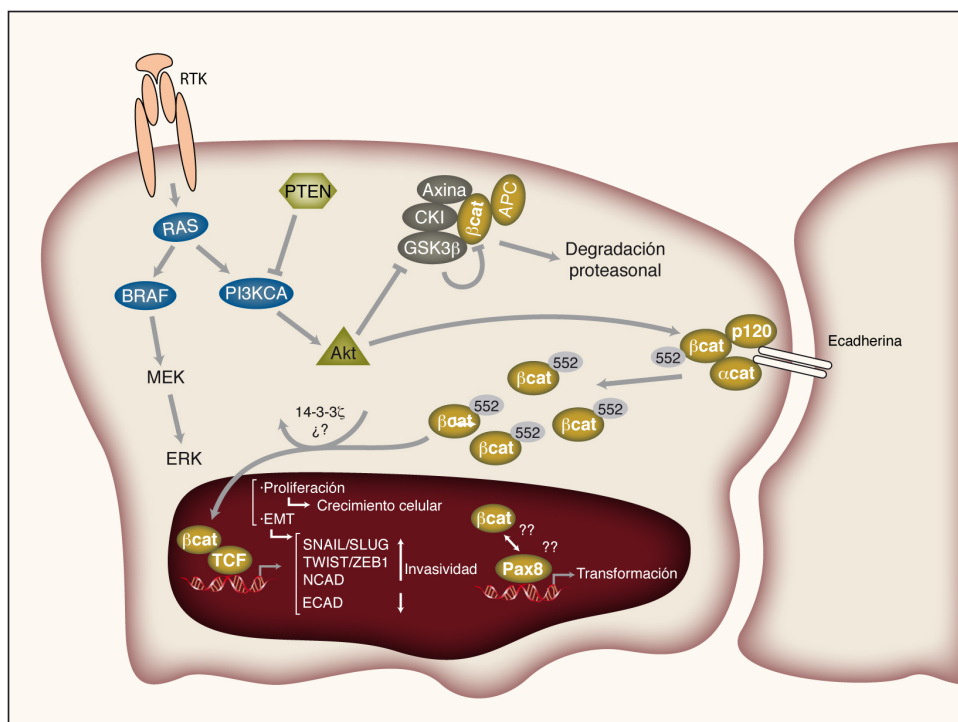


Fig 44-. Representación esquemática de la regulación de β catenina por la activación de la vía PI3K/Akt en células tumorales tiroideas. La activación de la quinasa Akt por mutaciones en los genes de HRAS o PI3K o deleciones en PTEN, induce la inhibición de la quinasa GSK3 β y la fosforilación de la β catenina en la S552. Esto resulta en la liberación de β catenina de las uniones adherentes y su estabilización en el citoplasma y núcleo de las células tumorales. En el núcleo β catenina interacciona y aumenta la actividad transcripcional de los factores de transcripción TCF activando la expresión de genes relacionados con proliferación (ciclinaD1) y con transición epitelio-mesénquima (EMT) regulando en crecimiento tumoral y la capacidad invasiva de las células tumorales tiroideas. Las flechas indican activación y las líneas truncadas inhibición.

Conclusiones

1. Las células tiroideas expresan todos los componentes de la vía Wnt canónica y responden a la activación de la misma.
2. La TSH y el IGF1, activando las vías de la PKA y la PI3K/Akt, inducen la localización nuclear de β catenina a través de la inhibición de GSK3 β y de la fosforilación de la propia β catenina en las Serinas 552 y 675. En consecuencia ambos factores aumentan su actividad transcripcional.
3. La β catenina media la respuesta proliferativa inducida por la TSH y el IGF1 regulando la expresión de su gen diana ciclinaD1.
4. La β catenina regula la diferenciación de las células tiroideas activando la expresión de Pax8. Además su expresión se activa por los factores de transcripción TCF, CREB, Nkx2-1 y el propio Pax8, a través de secuencias localizadas en su promotor proximal.
5. La β catenina actúa como co-activador transcripcional del factor de transcripción Pax8.
6. La expresión del oncogén HRAS, pero no la del BRAF, resulta en la inhibición de la actividad de GSK3 β , la translocación al núcleo de β catenina y un aumento en la actividad transcripcional de los complejos β catenina/TCF.
7. La activación constitutiva, en las células tiroideas tumorales humanas, de la vía PI3K/Akt pero no la de las MAPK, induce la estabilización, localización nuclear y actividad transcripcional de β catenina posiblemente a través de su fosforilación en la S552.
8. El silenciamiento de β catenina en células tiroideas tumorales humanas induce la disminución del crecimiento y proliferación celular a través de la entrada en senescencia.
9. El silenciamiento de β catenina induce la inhibición de la expresión de marcadores mesenquimales y un aumento de la expresión de marcadores epiteliales, sugiriendo una transición mesenquima-epitelio que se correlaciona con una disminución de la capacidad invasiva de las células tumorales.
10. El silenciamiento de β catenina reduce el crecimiento tumoral de las células tumorales tiroideas.

Bibliografía



- Abubaker J, Jehan Z, Bavi P, Sultana M, Al-Harbi S, Ibrahim M, Al-Nuaim A, Ahmed M, Amin T, Al-Fehaily M, et al. 2008 Clinicopathological analysis of papillary thyroid cancer with PIK3CA alterations in a Middle Eastern population. *J Clin Endocrinol Metab* **93** 611-618.
- Alexander NR, Tran NL, Rekapally H, Summers CE, Glackin C & Heimark RL 2006 N-cadherin gene expression in prostate carcinoma is modulated by integrin-dependent nuclear translocation of Twist1. *Cancer Res* **66** 3365-3369.
- Ambesi-Impiombato FS, Parks LA & Coon HG 1980 Culture of hormone-dependent functional epithelial cells from rat thyroids. *Proc Natl Acad Sci USA* **77** 3455-3459.
- Ariga M, Nedachi T, Akahori M, Sakamoto H, Ito Y, Hakuno F & Takahashi S 2000 Signalling pathways of insulin-like growth factor-I that are augmented by cAMP in FRTL-5 cells. *Biochem J* **348 Pt 2** 409-416.
- Baratta MG, Porreca I & Di Lauro R 2009 Oncogenic ras blocks the cAMP pathway and dedifferentiates thyroid cells via an impairment of pax8 transcriptional activity. *Mol Endocrinol* **23** 838-848.
- Berardi P, Meyyappan M & Riabowol KT 2003 A novel transcriptional inhibitory element differentially regulates the cyclin D1 gene in senescent cells. *J Biol Chem* **278** 7510-7519.
- Bernier-Valentin F, Kostrouch Z, Rabilloud R & Rousset B 1991 Analysis of the thyroglobulin internalization process using in vitro reconstituted thyroid follicles: evidence for a coated vesicle-dependent endocytic pathway. *Endocrinology* **129** 2194-2201.
- Blancquaert S, Wang L, Paternot S, Coulonval K, Dumont JE, Harris TE & Roger PP 2010 cAMP-dependent activation of mammalian target of rapamycin (mTOR) in thyroid cells. Implication in mitogenesis and activation of CDK4. *Mol Endocrinol* **24** 1453-1468.
- Brabant G, Hoang-Vu C, Cetin Y, Dralle H, Scheumann G, Molne J, Hansson G, Jansson S, Ericson LE & Nilsson M 1993 E-cadherin: a differentiation marker in thyroid malignancies. *Cancer Res* **53** 4987-4993.
- Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F & Kirchner T 1999 beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol* **155** 1033-1038.
- Bradford MM 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72** 248-254.
- Braverman LE CS, Werner SC & Ingbar SH 2013 Werner & Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text 4-21.
- Brenner-Gati L, Berg KA & Gershengorn MC 1988 Thyroid-stimulating hormone and insulin-like growth factor-1 synergize to elevate 1,2-diacylglycerol in rat thyroid cells. Stimulation of DNA synthesis via interaction between lipid and adenylyl cyclase signal transduction systems. *J Clin Invest* **82** 1144-1148.
- Brewer C, Yeager N & Di Cristofano A 2007 Thyroid-stimulating hormone initiated proliferative signals converge in vivo on the mTOR kinase without activating AKT. *Cancer Res* **67** 8002-8006.
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J & Greenberg ME 1999 Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96** 857-868.
- Buehler D, Hardin H, Shan W, Montemayor-Garcia C, Rush PS, Asioli S, Chen H & Lloyd RV 2012 Expression of epithelial-mesenchymal transition regulators SNAI2 and TWIST1 in thyroid carcinomas. *Mod Pathol*.
- Burikhanov R, Coulonval K, Pirson I, Lamy F, Dumont JE & Roger PP 1996 Thyrotropin via cyclic AMP induces insulin receptor expression and insulin Co-stimulation of growth and amplifies insulin and insulin-like growth factor signaling pathways in dog thyroid epithelial cells. *J Biol Chem* **271** 29400-29406.

- Burton DG, Sheerin AN, Ostler EL, Smith K, Giles PJ, Lowe J, Rhys-Williams W, Kipling DG & Faragher RG 2007 Cyclin D1 overexpression permits the reproducible detection of senescent human vascular smooth muscle cells. *Ann N Y Acad Sci* **1119** 20-31.
- Calebiro D, de Filippis T, Lucchi S, Martinez F, Porazzi P, Trivellato R, Locati M, Beck-Peccoz P & Persani L 2006 Selective modulation of protein kinase A I and II reveals distinct roles in thyroid cell gene expression and growth. *Mol Endocrinol* **20** 3196-3211.
- Calebiro D, Nikolaev VO, Gagliani MC, de Filippis T, Dees C, Tacchetti C, Persani L & Lohse MJ 2009 Persistent cAMP-signals triggered by internalized G-protein-coupled receptors. *PLoS Biol* **7** e1000172.
- Cali G, Gentile F, Mogavero S, Pallante P, Nitsch R, Ciancia G, Ferraro A, Fusco A & Nitsch L 2012 CDH16/Ksp-Cadherin Is Expressed in the Developing Thyroid Gland and Is Strongly Down-Regulated in Thyroid Carcinomas. *Endocrinology* **153** 522-534.
- Cass LA, Summers SA, Prendergast GV, Backer JM, Birnbaum MJ & Meinkoth JL 1999 Protein kinase A-dependent and -independent signaling pathways contribute to cyclic AMP-stimulated proliferation. *Mol Cell Biol* **19** 5882-5891.
- Cassinelli G, Favini E, Degl'Innocenti D, Salvi A, De Petro G, Pierotti MA, Zunino F, Borrello MG & Lanzi C 2009 RET/PTC1-driven neoplastic transformation and proinvasive phenotype of human thyrocytes involve Met induction and beta-catenin nuclear translocation. *Neoplasia* **11** 10-21.
- Castellone MD, De Falco V, Rao DM, Bellelli R, Muthu M, Basolo F, Fusco A, Gutkind JS & Santoro M 2009 The beta-catenin axis integrates multiple signals downstream from RET/papillary thyroid carcinoma leading to cell proliferation. *Cancer Res* **69** 1867-1876.
- Chan TO, Rittenhouse SE & Tsichlis PN 1999 AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu Rev Biochem* **68** 965-1014.
- Chen CA & Okayama H 1988 Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* **6** 632-638.
- Chen G, Jiang Q, You Z, Yao J, Mou L, Lin X, Shen X, You T, Lin Q, Wen J, et al. 2010 Regulation of GSK-3 beta in the proliferation and apoptosis of human thyrocytes investigated using a GSK-3 beta-targeting RNAi adenovirus expression vector: involvement the Wnt/beta-catenin pathway. *Mol Biol Rep* **37** 2773-2779.
- Chin L, Artandi SE, Shen Q, Tam A, Lee SL, Gottlieb GJ, Greider CW & DePinho RA 1999 p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell* **97** 527-538.
- Choi HJ, Huber AH & Weis WI 2006 Thermodynamics of beta-catenin-ligand interactions: the roles of the N- and C-terminal tails in modulating binding affinity. *J Biol Chem* **281** 1027-1038.
- Christophe-Hobertus C, Lefort A, Libert F & Christophe D 2012 Functional inactivation of thyroid transcription factor-1 in PCCl3 thyroid cells. *Mol Cell Endocrinol* **358** 36-45.
- Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR & Goodman RH 1993 Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* **365** 855-859.
- Chun JT, Di Dato V, D'Andrea B, Zannini M & Di Lauro R 2004 The CRE-like element inside the 5'-upstream region of the rat sodium/iodide symporter gene interacts with diverse classes of b-Zip molecules that regulate transcriptional activities through strong synergy with Pax-8. *Mol Endocrinol* **18** 2817-2829.
- Chung SH, Onoda N, Ishikawa T, Ogisawa K, Takenaka C, Yano Y, Hato F & Hirakawa K 2002 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation induces cell cycle arrest via the p53-independent pathway in human anaplastic thyroid cancer cells. *Jpn J Cancer Res* **93** 1358-1365.
- Cirafici AM, Pepe S, Mincione G, Esposito D & Colletta G 1992 TGF beta inhibits rat thyroid cell proliferation without alterations in the expression of TSH-induced cell cycle-related genes. *Biochem Biophys Res Commun* **187** 225-233.

- Civitareale D, Castelli MP, Falasca P & Saiardi A 1993 Thyroid transcription factor 1 activates the promoter of the thyrotropin receptor gene. *Mol Endocrinol* **7** 1589-1595.
- Clement S, Refetoff S, Robaye B, Dumont JE & Schurmans S 2001 Low TSH requirement and goiter in transgenic mice overexpressing IGF-I and IGF-Ir receptor in the thyroid gland. *Endocrinology* **142** 5131-5139.
- Clevers H 2006 Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* **127** 469-480.
- Collado M, Blasco MA & Serrano M 2007 Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* **130** 223-233.
- Collado M, Medema RH, Garcia-Cao I, Dubuisson ML, Barradas M, Glassford J, Rivas C, Burgering BM, Serrano M & Lam EW 2000 Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27Kip1. *J Biol Chem* **275** 21960-21968.
- Costamagna E, Garcia B & Santisteban P 2004 The functional interaction between the paired domain transcription factor Pax8 and Smad3 is involved in transforming growth factor-beta repression of the sodium/iodide symporter gene. *J Biol Chem* **279** 3439-3446.
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M & Hemmings BA 1995 Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378** 785-789.
- Dai G, Levy O & Carrasco N 1996 Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* **379** 458-460.
- Damalas A, Kahan S, Shtutman M, Ben-Ze'ev A & Oren M 2001 Deregulated beta-catenin induces a p53- and ARF-dependent growth arrest and cooperates with Ras in transformation. *EMBO J* **20** 4912-4922.
- Daniels DL & Weis WI 2005 Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat Struct Mol Biol* **12** 364-371.
- DasGupta R & Fuchs E 1999 Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation. *Development* **126** 4557-4568.
- Davidson G, Wu W, Shen J, Bilic J, Fenger U, Stanek P, Glinka A & Niehrs C 2005 Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* **438** 867-872.
- de Cristofaro T, Di Palma T, Fichera I, Lucci V, Parrillo L, De Felice M & Zannini M 2012 An essential role for pax8 in the transcriptional regulation of cadherin-16 in thyroid cells. *Mol Endocrinol* **26** 67-78.
- De Deken X, Wang D, Dumont JE & Miot F 2002 Characterization of ThOX proteins as components of the thyroid H₂O₂-generating system. *Exp Cell Res* **273** 187-196.
- De Felice M & Di Lauro R 2011 Minireview: Intrinsic and extrinsic factors in thyroid gland development: an update. *Endocrinology* **152** 2948-2956.
- De Felice M, Ovitt C, Biffali E, Rodriguez-Mallon A, Arra C, Anastassiadis K, Macchia PE, Mattei MG, Mariano A, Scholer H, et al. 1998 A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate. *Nat Genet* **19** 395-398.
- De Felice M, Postiglione MP & Di Lauro R 2004 Minireview: thyrotropin receptor signaling in development and differentiation of the thyroid gland: insights from mouse models and human diseases. *Endocrinology* **145** 4062-4067.
- De Gregorio G, Coppa A, Cosentino C, Ucci S, Messina S, Nicolussi A, D'Inzeo S, Di Pardo A, Avvedimento EV & Porcellini A 2007 The p85 regulatory subunit of PI3K mediates TSH-cAMP-PKA growth and survival signals. *Oncogene* **26** 2039-2047.
- De Menna M, D'Amato V, Ferraro A, Fusco A, Di Lauro R, Garbi C & De Vita G 2012 Wnt4 inhibits cell motility induced by oncogenic Ras. *Oncogene*.
- De Vita G, Bauer L, da Costa VM, De Felice M, Baratta MG, De Menna M & Di Lauro R 2005 Dose-dependent inhibition of thyroid differentiation by RAS oncogenes. *Mol Endocrinol* **19** 76-89.
- Degroot LJ & Niepomnyszcz H 1977 Biosynthesis of thyroid hormone: basic and clinical aspects. *Metabolism* **26** 665-718.

- Delmas V, Beermann F, Martinozzi S, Carreira S, Ackermann J, Kumasaka M, Denat L, Goodall J, Luciani F, Viros A, et al. 2007 Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development. *Genes Dev* **21** 2923-2935.
- Dere WH & Rapoport B 1986 Control of growth in cultured rat thyroid cells. *Mol Cell Endocrinol* **44** 195-199.
- Devlin MA, Das S, Singh I, Bourgoin S, Brindley DN & Ginsberg J 2000 The characterization of phospholipase D in FRTL-5 thyroid cells. *Mol Cell Endocrinol* **167** 107-115.
- Di Gennaro A, Spadaro O, Baratta MG, Di Lauro RM & De Felice M 2012 Functional Analysis of the Pax8 Promoter Reveals Autoregulation and the Presence of a Novel Thyroid-Specific DNA Binding Activity. *Thyroid*.
- Di Palma T, Conti A, de Cristofaro T, Scala S, Nitsch L & Zannini M 2011 Identification of novel Pax8 targets in FRTL-5 thyroid cells by gene silencing and expression microarray analysis. *PLoS One* **6** e25162.
- Di Palma T dCT, Filippone MG, Pierantoni GM, Fusco A & Zannini M 2012 Pax8 is a survival factor for thyroid cells and is involved in the control of cell proliferation. *European Thyroid J* **1 (Suppl 1)** pag 83, Abstract OP24.
- Di Palma T, Nitsch R, Mascia A, Nitsch L, Di Lauro R & Zannini M 2003 The paired domain-containing factor Pax8 and the homeodomain-containing factor TTF-1 directly interact and synergistically activate transcription. *J Biol Chem* **278** 3395-3402.
- Dremier S, Pohl V, Poteet-Smith C, Roger PP, Corbin J, Doskeland SO, Dumont JE & Maenhaut C 1997 Activation of cyclic AMP-dependent kinase is required but may not be sufficient to mimic cyclic AMP-dependent DNA synthesis and thyroglobulin expression in dog thyroid cells. *Mol Cell Biol* **17** 6717-6726.
- Dumont JE 1971 The action of thyrotropin on thyroid metabolism. *Vitam Horm* **29** 287-412.
- Dumont JE, Maenhaut C, Pirson I, Baptist M & Roger PP 1991 Growth factors controlling the thyroid gland. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* **5** 727-754.
- Dumont JE, Willems C, Van Sande J & Neve P 1971 Regulation of the release of thyroid hormones: role of cyclic AMP. *Ann NY Acad Sci* **185** 291-316.
- Dupre-Crochet S, Figueroa A, Hogan C, Ferber EC, Bialucha CU, Adams J, Richardson EC & Fujita Y 2007 Casein kinase 1 is a novel negative regulator of E-cadherin-based cell-cell contacts. *Mol Cell Biol* **27** 3804-3816.
- Elisei R & Pinchera A 2012 Advances in the follow-up of differentiated or medullary thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol* **8** 466-475.
- Espinoza CR, Schmitt TL & Loos U 2001 Thyroid transcription factor 1 and Pax8 synergistically activate the promoter of the human thyroglobulin gene. *J Mol Endocrinol* **27** 59-67.
- Essers MA, de Vries-Smiths LM, Barker N, Polderman PE, Burgering BM & Korswagen HC 2005 Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling. *Science* **308** 1181-1184.
- Estour B, Van Herle AJ, Juillard GJ, Totanes TL, Sparkes RS, Giuliano AE & Klandorf H 1989 Characterization of a human follicular thyroid carcinoma cell line (UCLA RO 82 W-1). *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **57** 167-174.
- Fabien N, Fusco A, Santoro M, Barbier Y, Dubois PM & Paulin C 1994 Description of a human papillary thyroid carcinoma cell line. Morphologic study and expression of tumoral markers. *Cancer* **73** 2206-2212.
- Fagin JA, Matsuo K, Karmakar A, Chen DL, Tang SH & Koeffler HP 1993 High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *J Clin Invest* **91** 179-184.
- Fagman H, Andersson L & Nilsson M 2006 The developing mouse thyroid: embryonic vessel contacts and parenchymal growth pattern during specification, budding, migration, and lobulation. *Dev Dyn* **235** 444-455.

- Fagman H & Nilsson M 2011 Morphogenetics of early thyroid development. *J Mol Endocrinol* **46** R33-42.
- Fang D, Hawke D, Zheng Y, Xia Y, Meisenhelder J, Nika H, Mills GB, Kobayashi R, Hunter T & Lu Z 2007 Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *J Biol Chem* **282** 11221-11229.
- Fang X, Yu SX, Lu Y, Bast RC, Jr., Woodgett JR & Mills GB 2000 Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** 11960-11965.
- Florio T, Scorizello A, Fattore M, D'Alto V, Salzano S, Rossi G, Berlingieri MT, Fusco A & Schettini G 1996 Somatostatin inhibits PC Cl3 thyroid cell proliferation through the modulation of phosphotyrosine activity. Impairment of the somatostatinergic effects by stable expression of E1A viral oncogene. *J Biol Chem* **271** 6129-6136.
- Fuerer C & Nusse R 2010 Lentiviral vectors to probe and manipulate the Wnt signaling pathway. *PLoS One* **5** e9370.
- Fujimoto J & Brenner-Gati L 1992 Protein kinase-C activation during thyrotropin-stimulated proliferation of rat FRTL-5 thyroid cells. *Endocrinology* **130** 1587-1592.
- Fukami-Kobayashi J & Mitsui Y 1998 The regulation of cyclin D1 expression in senescent human fibroblasts. *Exp Cell Res* **241** 435-444.
- Fukushima T, Nedachi T, Akizawa H, Akahori M, Hakuno F & Takahashi S 2008 Distinct modes of activation of phosphatidylinositol 3-kinase in response to cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate or insulin-like growth factor I play different roles in regulation of cyclin D1 and p27Kip1 in FRTL-5 cells. *Endocrinology* **149** 3729-3742.
- Fusco A, Berlingieri MT, Di Fiore PP, Portella G, Grieco M & Vecchio G 1987 One- and two-step transformations of rat thyroid epithelial cells by retroviral oncogenes. *Mol Cell Biol* **7** 3365-3370.
- Garcia B & Santisteban P 2002 PI3K is involved in the IGF-I inhibition of TSH-induced sodium/iodide symporter gene expression. *Mol Endocrinol* **16** 342-352.
- Garcia-Rostan G, Camp RL, Herrero A, Carcangiu ML, Rimm DL & Tallini G 2001 Beta-catenin dysregulation in thyroid neoplasms: down-regulation, aberrant nuclear expression, and CTNNB1 exon 3 mutations are markers for aggressive tumor phenotypes and poor prognosis. *Am J Pathol* **158** 987-996.
- Garcia-Rostan G, Costa AM, Pereira-Castro I, Salvatore G, Hernandez R, Hermsem MJ, Herrero A, Fusco A, Cameselle-Teijeiro J & Santoro M 2005 Mutation of the PIK3CA gene in anaplastic thyroid cancer. *Cancer Res* **65** 10199-10207.
- Garcia-Rostan G, Tallini G, Herrero A, D'Aquila TG, Carcangiu ML & Rimm DL 1999 Frequent mutation and nuclear localization of beta-catenin in anaplastic thyroid carcinoma. *Cancer Res* **59** 1811-1815.
- Gioanni J, Zanghellini E, Mazeau C, Zhang D, Courdi A, Farges M, Lambert JC, Duplay H & Schneider M 1991 [Characterization of a human cell line from an anaplastic carcinoma of the thyroid gland]. *Bull Cancer* **78** 1053-1062.
- Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R & Mathieu C 2001 An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* **25** 386-401.
- Gonzalez-Sancho JM, Aguilera O, Garcia JM, Pendas-Franco N, Pena C, Cal S, Garcia de Herreros A, Bonilla F & Munoz A 2005 The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer. *Oncogene* **24** 1098-1103.
- Goss AM, Tian Y, Tsukiyama T, Cohen ED, Zhou D, Lu MM, Yamaguchi TP & Morrissey EE 2009 Wnt2/2b and beta-catenin signaling are necessary and sufficient to specify lung progenitors in the foregut. *Dev Cell* **17** 290-298.
- Grasberger H, Ringkananont U, Lefrancois P, Abramowicz M, Vassart G & Refetoff S 2005 Thyroid transcription factor 1 rescues PAX8/p300 synergism impaired by a natural PAX8 paired domain mutation with dominant negative activity. *Mol Endocrinol* **19** 1779-1791.

- Guazzi S, Price M, De Felice M, Damante G, Mattei MG & Di Lauro R 1990 Thyroid nuclear factor 1 (TTF-1) contains a homeodomain and displays a novel DNA binding specificity. *EMBO J* **9** 3631-3639.
- Gujral TS, van Veelen W, Richardson DS, Myers SM, Meens JA, Acton DS, Dunach M, Elliott BE, Hoppener JW & Mulligan LM 2008 A novel RET kinase-beta-catenin signaling pathway contributes to tumorigenesis in thyroid carcinoma. *Cancer Res* **68** 1338-1346.
- Guturi KK, Mandal T, Chatterjee A, Sarkar M, Bhattacharya S, Chatterjee U & Ghosh MK 2012 Mechanism of beta-catenin-mediated transcriptional regulation of epidermal growth factor receptor expression in glycogen synthase kinase 3 beta-inactivated prostate cancer cells. *J Biol Chem* **287** 18287-18296.
- Haegel H, Larue L, Ohsugi M, Fedorov L, Herrenknecht K & Kemler R 1995 Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. *Development* **121** 3529-3537.
- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B & Kinzler KW 1998 Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* **281** 1509-1512.
- Heldin NE, Cvejic D, Smeds S & Westermark B 1991a Coexpression of functionally active receptors for thyrotropin and platelet-derived growth factor in human thyroid carcinoma cells. *Endocrinology* **129** 2187-2193.
- Heldin NE & Westermark B 1991b The molecular biology of the human anaplastic thyroid carcinoma cell. *Thyroidology* **3** 127-131.
- Helmbrecht K, Kispert A, von Wasielowski R & Brabant G 2001 Identification of a Wnt/beta-catenin signaling pathway in human thyroid cells. *Endocrinology* **142** 5261-5266.
- Henderson WR, Jr., Chi EY, Ye X, Nguyen C, Tien YT, Zhou B, Borok Z, Knight DA & Kahn M 2010 Inhibition of Wnt/beta-catenin/CREB binding protein (CBP) signaling reverses pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **107** 14309-14314.
- Hino S, Tanji C, Nakayama KI & Kikuchi A 2005 Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase stabilizes beta-catenin through inhibition of its ubiquitination. *Mol Cell Biol* **25** 9063-9072.
- Hou P, Liu D, Shan Y, Hu S, Studeman K, Condouris S, Wang Y, Trink A, El-Naggar AK, Tallini G, et al. 2007 Genetic alterations and their relationship in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Clin Cancer Res* **13** 1161-1170.
- Howe LR, Watanabe O, Leonard J & Brown AM 2003 Twist is up-regulated in response to Wnt1 and inhibits mouse mammary cell differentiation. *Cancer Res* **63** 1906-1913.
- Huang SM, Mishina YM, Liu S, Cheung A, Stegmeier F, Michaud GA, Charlat O, Wiellette E, Zhang Y, Wiessner S, et al. 2009 Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature* **461** 614-620.
- Huber AH, Nelson WJ & Weis WI 1997 Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* **90** 871-882.
- Huelsken J, Vogel R, Brinkmann V, Erdmann B, Birchmeier C & Birchmeier W 2000 Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice. *J Cell Biol* **148** 567-578.
- Indolfi C, Avvedimento EV, Di Lorenzo E, Esposito G, Rapacciuolo A, Giuliano P, Grieco D, Cavuto L, Stingone AM, Ciullo I, et al. 1997 Activation of cAMP-PKA signaling in vivo inhibits smooth muscle cell proliferation induced by vascular injury. *Nat Med* **3** 775-779.
- Ishigaki K, Namba H, Nakashima M, Nakayama T, Mitsutake N, Hayashi T, Maeda S, Ichinose M, Kanematsu T & Yamashita S 2002 Aberrant localization of beta-catenin correlates with overexpression of its target gene in human papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* **87** 3433-3440.
- Ishizaka Y, Itoh F, Tahira T, Ikeda I, Ogura T, Sugimura T & Nagao M 1989 Presence of aberrant transcripts of ret proto-oncogene in a human papillary thyroid carcinoma cell line. *Jpn J Cancer Res* **80** 1149-1152.

- Isozaki O, Santisteban P, Chan J, Grollman E & Kohn L 1987 Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) regulate differentiation as well as growth in FRTL-5 cells. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)* **281** 288-292.
- Ito T, Seyama T, Mizuno T, Tsuyama N, Hayashi Y, Dohi K, Nakamura N & Akiyama M 1993 Genetic alterations in thyroid tumor progression: association with p53 gene mutations. *Jpn J Cancer Res* **84** 526-531.
- Jeker LT, Hejazi M, Burek CL, Rose NR & Caturegli P 1999 Mouse thyroid primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* **257** 511-515.
- Kambe F, Nomura Y, Okamoto T & Seo H 1996 Redox regulation of thyroid-transcription factors, Pax-8 and TTF-1, is involved in their increased DNA-binding activities by thyrotropin in rat thyroid FRTL-5 cells. *Mol Endocrinol* **10** 801-812.
- Kang DE, Soriano S, Xia X, Eberhart CG, De Strooper B, Zheng H & Koo EH 2002 Presenilin couples the paired phosphorylation of beta-catenin independent of axin: implications for beta-catenin activation in tumorigenesis. *Cell* **110** 751-762.
- Kelly KF, Ng DY, Jayakumaran G, Wood GA, Koide H & Doble BW 2011 beta-catenin enhances Oct-4 activity and reinforces pluripotency through a TCF-independent mechanism. *Cell Stem Cell* **8** 214-227.
- Kim JH, Kim SW, Jung PJ, Yon C, Kim SC & Han JS 2002 Phosphatidylcholine-specific phospholipase C and RhoA are involved in the thyrotropin-induced activation of phospholipase D in FRTL-5 thyroid cells. *Mol Cells* **14** 272-280.
- Kim WB, Lewis CJ, McCall KD, Malgor R, Kohn AD, Moon RT & Kohn LD 2007 Overexpression of Wnt-1 in thyrocytes enhances cellular growth but suppresses transcription of the thyroperoxidase gene via different signaling mechanisms. *J Endocrinol* **193** 93-106.
- Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE & Fagin JA 2003 High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* **63** 1454-1457.
- Kimura S, Hara Y, Pineau T, Fernandez-Salguero P, Fox CH, Ward JM & Gonzalez FJ 1996 The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes Dev* **10** 60-69.
- Kimura T, Dumont JE, Fusco A & Golstein J 1999 Insulin and TSH promote growth in size of PC Cl3 rat thyroid cells, possibly via a pathway different from DNA synthesis: comparison with FRTL-5 cells. *Eur J Endocrinol* **140** 94-103.
- Knauf JA, Sartor MA, Medvedovic M, Lundsmith E, Ryder M, Salzano M, Nikiforov YE, Giordano TJ, Ghossein RA & Fagin JA 2011 Progression of BRAF-induced thyroid cancer is associated with epithelial-mesenchymal transition requiring concomitant MAP kinase and TGFbeta signaling. *Oncogene* **30** 3153-3162.
- Kobiela K, Stokes N, de la Cruz J, Polak L & Fuchs E 2007 Loss of a quiescent niche but not follicle stem cells in the absence of bone morphogenetic protein signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104** 10063-10068.
- Kogai T, Sajid-Crockett S, Newmarch LS, Liu YY & Brent GA 2008 Phosphoinositide-3-kinase inhibition induces sodium/iodide symporter expression in rat thyroid cells and human papillary thyroid cancer cells. *J Endocrinol* **199** 243-252.
- Kremenevskaja N, von Wasielewski R, Rao AS, Schofl C, Andersson T & Brabant G 2005 Wnt-5a has tumor suppressor activity in thyroid carcinoma. *Oncogene* **24** 2144-2154.
- Kuppersman E, Wen W & Meinkoth JL 1993 Inhibition of thyrotropin-stimulated DNA synthesis by microinjection of inhibitors of cellular Ras and cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol* **13** 4477-4484.
- Kurebayashi J, Otsuki T, Tanaka K, Yamamoto Y, Moriya T & Sonoo H 2003 Medroxyprogesterone acetate decreases secretion of interleukin-6 and parathyroid hormone-related protein in a new anaplastic thyroid cancer cell line, KTC-2. *Thyroid* **13** 249-258.

- Kurihara T, Ikeda S, Ishizaki Y, Fujimori M, Tokumoto N, Hirata Y, Ozaki S, Okajima M, Sugino K & Asahara T 2004 Immunohistochemical and sequencing analyses of the Wnt signaling components in Japanese anaplastic thyroid cancers. *Thyroid* **14** 1020-1029.
- Kwok RP, Lundblad JR, Chrivia JC, Richards JP, Bachinger HP, Brennan RG, Roberts SG, Green MR & Goodman RH 1994 Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* **370** 223-226.
- Lazzaro D, Price M, de Felice M & Di Lauro R 1991 The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain. *Development* **113** 1093-1104.
- Lazzereschi D, Coppa A, Minicione G, Lavitrano M, Fragomele F & Colletta G 1997 The phosphatase inhibitor okadaic acid stimulates the TSH-induced G1-S phase transition in thyroid cells. *Exp Cell Res* **234** 425-433.
- Lazzereschi D, Sambuco L, Carnovale Scalzo C, Ranieri A, Mincione G, Nardi F & Colletta G 1998 Cyclin D1 and Cyclin E expression in malignant thyroid cells and in human thyroid carcinomas. *Int J Cancer* **76** 806-811.
- Ledent C, Dumont JE, Vassart G & Parmentier M 1992 Thyroid expression of an A2 adenosine receptor transgene induces thyroid hyperplasia and hyperthyroidism. *EMBO J* **11** 537-542.
- Lee E, Salic A, Kruger R, Heinrich R & Kirschner MW 2003 The roles of APC and Axin derived from experimental and theoretical analysis of the Wnt pathway. *PLoS Biol* **1** E10.
- Lee G, Goretsky T, Managlia E, Dirisina R, Singh AP, Brown JB, May R, Yang GY, Ragheb JW, Evers BM, et al. 2010 Phosphoinositide 3-kinase signaling mediates beta-catenin activation in intestinal epithelial stem and progenitor cells in colitis. *Gastroenterology* **139** 869-881, 881 e861-869.
- Lemoine NR, Mayall ES, Jones T, Sheer D, McDermid S, Kendall-Taylor P & Wynford-Thomas D 1989 Characterisation of human thyroid epithelial cells immortalised in vitro by simian virus 40 DNA transfection. *Br J Cancer* **60** 897-903.
- Lepourcelet M, Chen YN, France DS, Wang H, Crews P, Petersen F, Bruseo C, Wood AW & Shivdasani RA 2004 Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/beta-catenin protein complex. *Cancer Cell* **5** 91-102.
- Lewis AE, Fikaris AJ, Prendergast GV & Meinkoth JL 2004 Thyrotropin and serum regulate thyroid cell proliferation through differential effects on p27 expression and localization. *Mol Endocrinol* **18** 2321-2332.
- Li CG, Nyman JE, Braithwaite AW & Eccles MR 2011 PAX8 promotes tumor cell growth by transcriptionally regulating E2F1 and stabilizing RB protein. *Oncogene* **30** 4824-4834.
- Li DM & Sun H 1998 PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** 15406-15411.
- Lin HK, Chen Z, Wang G, Nardella C, Lee SW, Chan CH, Yang WL, Wang J, Egia A, Nakayama KI, et al. 2010 Skp2 targeting suppresses tumorigenesis by Arf-p53-independent cellular senescence. *Nature* **464** 374-379.
- Lin RY 2011 Thyroid cancer stem cells. *Nat Rev Endocrinol* **7** 609-616.
- Liu Z, Hou P, Ji M, Guan H, Studeman K, Jensen K, Vasko V, El-Naggar AK & Xing M 2008 Highly prevalent genetic alterations in receptor tyrosine kinases and phosphatidylinositol 3-kinase/akt and mitogen-activated protein kinase pathways in anaplastic and follicular thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab* **93** 3106-3116.
- Liu Z, Kakudo K, Bai Y, Li Y, Ozaki T, Miyauchi A, Taniguchi E & Mori I 2011 Loss of cellular polarity/cohesiveness in the invasive front of papillary thyroid carcinoma, a novel predictor for lymph node metastasis; possible morphological indicator of epithelial mesenchymal transition. *J Clin Pathol* **64** 325-329.
- Mansouri A, Chowdhury K & Gruss P 1998 Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. *Nat Genet* **19** 87-90.

- Marians RC, Ng L, Blair HC, Unger P, Graves PN & Davies TF 2002 Defining thyrotropin-dependent and -independent steps of thyroid hormone synthesis by using thyrotropin receptor-null mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **99** 15776-15781.
- Marotta P AE, De Luca P, Zoppoli P, Di Lauro R & De Felice M. 2012 Pax8 Expression is required for the differentiation of thyroid follicular cells. *European Thyroid J* **1** (Supp1) pag 83, Abstract OP23.
- Martinez Barbera JP, Clements M, Thomas P, Rodriguez T, Meloy D, Kioussis D & Beddington RS 2000 The homeobox gene Hex is required in definitive endodermal tissues for normal forebrain, liver and thyroid formation. *Development* **127** 2433-2445.
- Mascia A, Nitsch L, Di Lauro R & Zannini M 2002 Hormonal control of the transcription factor Pax8 and its role in the regulation of thyroglobulin gene expression in thyroid cells. *J Endocrinol* **172** 163-176.
- May PB & Donabedian RK 1973 Thyrotropin releasing hormone (TRH) mediated thyroid-stimulating hormone (TSH) release from human anterior pituitary tissue in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* **36** 605-607.
- Medema RH, Kops GJ, Bos JL & Burgering BM 2000 AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* **404** 782-787.
- Medina DL & Santisteban P 2000a Thyrotropin-dependent proliferation of in vitro rat thyroid cell systems. *Eur J Endocrinol* **143** 161-178.
- Medina DL, Suzuki K, Pietrarelli M, Okajima F, Kohn LD & Santisteban P 2000b Role of insulin and serum on thyrotropin regulation of thyroid transcription factor-1 and pax-8 genes expression in FRTL-5 thyroid cells. *Thyroid* **10** 295-303.
- Medina DL, Toro MJ & Santisteban P 2000c Somatostatin interferes with thyrotropin-induced G1-S transition mediated by cAMP-dependent protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. Involvement of RhoA and cyclin E x cyclin-dependent kinase 2 complexes. *J Biol Chem* **275** 15549-15556.
- Meirmanov S, Nakashima M, Kondo H, Matsufuji R, Takamura N, Ishigaki K, Ito M, Prouglo Y, Yamashita S & Sekine I 2003 Correlation of cytoplasmic beta-catenin and cyclin D1 overexpression during thyroid carcinogenesis around Semipalatinsk nuclear test site. *Thyroid* **13** 537-545.
- Mendez-Pertuz M, Sanchez-Pacheco A & Aranda A 2003 The thyroid hormone receptor antagonizes CREB-mediated transcription. *EMBO J* **22** 3102-3112.
- Merrill BJ, Gat U, DasGupta R & Fuchs E 2001 Tcf3 and Lef1 regulate lineage differentiation of multipotent stem cells in skin. *Genes Dev* **15** 1688-1705.
- Michael LF, Asahara H, Shulman AI, Kraus WL & Montminy M 2000 The phosphorylation status of a cyclic AMP-responsive activator is modulated via a chromatin-dependent mechanism. *Mol Cell Biol* **20** 1596-1603.
- Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, Majoor DM, Shay JW, Mooi WJ & Peeper DS 2005 BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **436** 720-724.
- Mincione G, Esposito DL, Di Marcantonio MC, Piccirelli A, Cama A & Colletta G 2003 TGF-beta 1 modulation of IGF-I signaling pathway in rat thyroid epithelial cells. *Exp Cell Res* **287** 411-423.
- Mitsutake N, Knauf JA, Mitsutake S, Mesa C, Jr., Zhang L & Fagin JA 2005 Conditional BRAFV600E expression induces DNA synthesis, apoptosis, dedifferentiation, and chromosomal instability in thyroid PCCL3 cells. *Cancer Res* **65** 2465-2473.
- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B & Kinzler KW 1997 Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* **275** 1787-1790.
- Morkel M, Huelsken J, Wakamiya M, Ding J, van de Wetering M, Clevers H, Taketo MM, Behringer RR, Shen MM & Birchmeier W 2003 Beta-catenin regulates Cripto- and Wnt3-dependent gene expression programs in mouse axis and mesoderm formation. *Development* **130** 6283-6294.

- Mosimann C, Hausmann G & Basler K 2009 Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10** 276-286.
- Mu D, Huang R, Li S, Ma X, Lou C & Kuang A 2012 Combining transfer of TTF-1 and Pax-8 gene: a potential strategy to promote radioiodine therapy of thyroid carcinoma. *Cancer Gene Ther* **19** 402-411.
- Muller K, Fuhrer D, Mittag J, Kloting N, Bluher M, Weiss RE, Many MC, Schmid KW & Krohn K 2011 TSH compensates thyroid-specific IGF-I receptor knockout and causes papillary thyroid hyperplasia. *Mol Endocrinol* **25** 1867-1879.
- Nellore A, Paziana K, Ma C, Tsygankova OM, Wang Y, Puttaswamy K, Iqbal AU, Franks SR, Lv Y, Troxel AB, et al. 2009 Loss of Rap1 GAP in papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* **94** 1026-1032.
- Nguyen LQ, Kopp P, Martinson F, Stanfield K, Roth SI & Jameson JL 2000 A dominant negative CREB (cAMP response element-binding protein) isoform inhibits thyrocyte growth, thyroid-specific gene expression, differentiation, and function. *Mol Endocrinol* **14** 1448-1461.
- Nikiforov YE & Nikiforova MN 2011 Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol* **7** 569-580.
- Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, Zhu Z, Giannini R, Salvatore G, Fusco A, et al. 2003 BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* **88** 5399-5404.
- Nishihara E, Nagayama Y, Mawatari F, Tanaka K, Namba H, Niwa M & Yamashita S 1997 Retrovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase gene transduction renders human thyroid carcinoma cell lines sensitive to ganciclovir and radiation in vitro and in vivo. *Endocrinology* **138** 4577-4583.
- Nishita M, Enomoto M, Yamagata K & Minami Y 2010 Cell/tissue-tropic functions of Wnt5a signaling in normal and cancer cells. *Trends Cell Biol* **20** 346-354.
- Nitsch R, Di Dato V, di Gennaro A, de Cristofaro T, Abbondante S, De Felice M, Zannini M & Di Lauro R 2010 Comparative genomics reveals a functional thyroid-specific element in the far upstream region of the PAX8 gene. *BMC Genomics* **11** 306.
- Nonaka D, Tang Y, Chiriboga L, Rivera M & Ghossein R 2008 Diagnostic utility of thyroid transcription factors Pax8 and TTF-2 (FoxE1) in thyroid epithelial neoplasms. *Mod Pathol* **21** 192-200.
- Ock S, Lee SH, Ahn J, Lee TJ, Cho CH, Abel ED, Kimura S & Kim J 2011 Conditional deletion of insulin receptor in thyrocytes does not affect thyroid structure and function. *Endocr J* **58** 1013-1019.
- Ohno M, Zannini M, Levy O, Carrasco N & di Lauro R 1999 The paired-domain transcription factor Pax8 binds to the upstream enhancer of the rat sodium/iodide symporter gene and participates in both thyroid-specific and cyclic-AMP-dependent transcription. *Mol Cell Biol* **19** 2051-2060.
- Ortiz L, Zannini M, Di Lauro R & Santisteban P 1997 Transcriptional control of the forkhead thyroid transcription factor TTF-2 by thyrotropin, insulin, and insulin-like growth factor I. *J Biol Chem* **272** 23334-23339.
- Ozcan A, Shen SS, Hamilton C, Anjana K, Coffey D, Krishnan B & Truong LD 2011 PAX 8 expression in non-neoplastic tissues, primary tumors, and metastatic tumors: a comprehensive immunohistochemical study. *Mod Pathol* **24** 751-764.
- Park JS, Valerius MT & McMahon AP 2007 Wnt/beta-catenin signaling regulates nephron induction during mouse kidney development. *Development* **134** 2533-2539.
- Park YJ, Park ES, Kim MS, Kim TY, Lee HS, Lee S, Jang IS, Shong M, Park DJ & Cho BY 2002 Involvement of the protein kinase C pathway in thyrotropin-induced STAT3 activation in FRTL-5 thyroid cells. *Mol Cell Endocrinol* **194** 77-84.
- Parlato R, Rosica A, Rodriguez-Mallon A, Affuso A, Postiglione MP, Arra C, Mansouri A, Kimura S, Di Lauro R & De Felice M 2004 An integrated regulatory network controlling survival and migration in thyroid organogenesis. *Dev Biol* **276** 464-475.

- Pasca di Magliano M, Di Lauro R & Zannini M 2000 Pax8 has a key role in thyroid cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** 13144-13149.
- Pascual A & Aranda A 2012 Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation. *Biochim Biophys Acta*.
- Paternot S, Dumont JE & Roger PP 2006 Differential utilization of cyclin D1 and cyclin D3 in the distinct mitogenic stimulations by growth factors and TSH of human thyrocytes in primary culture. *Mol Endocrinol* **20** 3279-3292.
- Peinado H, Olmeda D & Cano A 2007 Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* **7** 415-428.
- Perona R, Montaner S, Saniger L, Sanchez-Perez I, Bravo R & Lacal JC 1997 Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev* **11** 463-475.
- Piedra J, Martinez D, Castano J, Miravet S, Dunach M & de Herreros AG 2001 Regulation of beta-catenin structure and activity by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* **276** 20436-20443.
- Pinto D, Gregorieff A, Begthel H & Clevers H 2003 Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev* **17** 1709-1713.
- Pirson I, Coulonval K, Lamy F & Dumont JE 1996 c-Myc expression is controlled by the mitogenic cAMP-cascade in thyrocytes. *J Cell Physiol* **168** 59-70.
- Pohlenz J, Dumitrescu A, Zundel D, Martine U, Schonberger W, Koo E, Weiss RE, Cohen RN, Kimura S & Refetoff S 2002 Partial deficiency of thyroid transcription factor 1 produces predominantly neurological defects in humans and mice. *J Clin Invest* **109** 469-473.
- Polyak K & Weinberg RA 2009 Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* **9** 265-273.
- Postiglione MP, Parlato R, Rodriguez-Mallon A, Rosica A, Mithbaokar P, Maresca M, Mariani RC, Davies TF, Zannini MS, De Felice M, et al. 2002 Role of the thyroid-stimulating hormone receptor signaling in development and differentiation of the thyroid gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** 15462-15467.
- Rakhra K, Bachireddy P, Zabuawala T, Zeiser R, Xu L, Kopelman A, Fan AC, Yang Q, Braunstein L, Crosby E, et al. 2010 CD4(+) T cells contribute to the remodeling of the microenvironment required for sustained tumor regression upon oncogene inactivation. *Cancer Cell* **18** 485-498.
- Rao AS, Goretzki PE, Kohrle J & Brabant G 2005 Letter Re: Id1 gene expression in hyperplastic and neoplastic thyroid tissues. *J Clin Endocrinol Metab* **90** 5906.
- Rezk S, Brynes RK, Nelson V, Thein M, Patwardhan N, Fischer A & Khan A 2004 beta-Catenin expression in thyroid follicular lesions: potential role in nuclear envelope changes in papillary carcinomas. *Endocr Pathol* **15** 329-337.
- Ricarte-Filho JC, Ryder M, Chitale DA, Rivera M, Heguy A, Ladanyi M, Janakiraman M, Solit D, Knauf JA, Tuttle RM, et al. 2009 Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for BRAF, PIK3CA, and AKT1. *Cancer Res* **69** 4885-4893.
- Riesco-Eizaguirre G, Gutierrez-Martinez P, Garcia-Cabezas MA, Nistal M & Santisteban P 2006 The oncogene BRAF V600E is associated with a high risk of recurrence and less differentiated papillary thyroid carcinoma due to the impairment of Na⁺/I⁻ targeting to the membrane. *Endocr Relat Cancer* **13** 257-269.
- Riesco-Eizaguirre G, Rodriguez I, De la Vieja A, Costamagna E, Carrasco N, Nistal M & Santisteban P 2009 The BRAFV600E oncogene induces transforming growth factor beta secretion leading to sodium iodide symporter repression and increased malignancy in thyroid cancer. *Cancer Res* **69** 8317-8325.
- Riesco-Eizaguirre G & Santisteban P 2007 Molecular biology of thyroid cancer initiation. *Clin Transl Oncol* **9** 686-693.
- Ringel MD, Hayre N, Saito J, Saunier B, Schuppert F, Burch H, Bernet V, Burman KD, Kohn LD & Saji M 2001 Overexpression and overactivation of Akt in thyroid carcinoma. *Cancer Res* **61** 6105-6111.

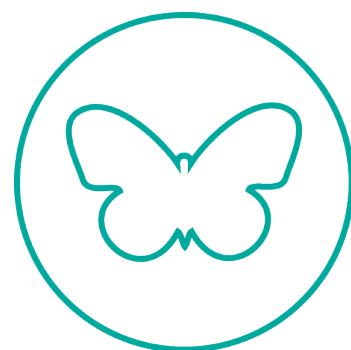
- Roger PP & Dumont JE 1984 Factors controlling proliferation and differentiation of canine thyroid cells cultured in reduced serum conditions: effects of thyrotropin, cyclic AMP and growth factors. *Mol Cell Endocrinol* **36** 79-93.
- Rossi DL, Acebron A & Santisteban P 1995 Function of the homeo and paired domain proteins TTF-1 and Pax-8 in thyroid cell proliferation. *J Biol Chem* **270** 23139-23142.
- Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S & Polakis P 1996 Binding of GSK3 β to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* **272** 1023-1026.
- Ruiz-Llorente S, de Pau EC, Sastre-Perona A, Montero-Conde C, Gomez-Lopez G, Fagin JA, Valencia A, Pisano DG & Santisteban P 2012 Genome-wide analysis of Pax8 binding provides new insights into thyroid functions. *BMC Genomics* **13** 147.
- Saavedra HI, Knauf JA, Shirokawa JM, Wang J, Ouyang B, Elisei R, Stambrook PJ & Fagin JA 2000 The RAS oncogene induces genomic instability in thyroid PCCL3 cells via the MAPK pathway. *Oncogene* **19** 3948-3954.
- Saegusa M, Hashimura M, Kuwata T & Okayasu I 2009 Requirement of the Akt/beta-catenin pathway for uterine carcinosarcoma genesis, modulating E-cadherin expression through the transactivation of slug. *Am J Pathol* **174** 2107-2115.
- Saito J, Kohn AD, Roth RA, Noguchi Y, Tatsumo I, Hirai A, Suzuki K, Kohn LD, Saji M & Ringel MD 2001 Regulation of FRTL-5 thyroid cell growth by phosphatidylinositol (OH) 3 kinase-dependent Akt-mediated signaling. *Thyroid* **11** 339-351.
- Saito T, Endo T, Nakazato M, Kogai T & Onaya T 1997 Thyroid-stimulating hormone-induced down-regulation of thyroid transcription factor 1 in rat thyroid FRTL-5 cells. *Endocrinology* **138** 602-606.
- Saiz AD, Olvera M, Rezk S, Florentine BA, McCourty A & Brynes RK 2002 Immunohistochemical expression of cyclin D1, E2F-1, and Ki-67 in benign and malignant thyroid lesions. *J Pathol* **198** 157-162.
- Sakai D, Tanaka Y, Endo Y, Osumi N, Okamoto H & Wakamatsu Y 2005 Regulation of Slug transcription in embryonic ectoderm by beta-catenin-Lef/Tcf and BMP-Smad signaling. *Dev Growth Differ* **47** 471-482.
- Santarpia L, El-Naggar AK, Cote GJ, Myers JN & Sherman SI 2008 Phosphatidylinositol 3-kinase/akt and ras/raf-mitogen-activated protein kinase pathway mutations in anaplastic thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* **93** 278-284.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM & Sabatini DM 2005 Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307** 1098-1101.
- Sato T, Omura M, Saito J, Hirasawa A, Kakuta Y, Wakabayashi Y & Nishikawa T 2000 Neutrophilia associated with anaplastic carcinoma of the thyroid: production of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and interleukin-6. *Thyroid* **10** 1113-1118.
- Schmidt-Ott KM, Masckauchan TN, Chen X, Hirsh BJ, Sarkar A, Yang J, Paragas N, Wallace VA, Dufort D, Pavlidis P, et al. 2007 beta-catenin/TCF/Lef controls a differentiation-associated transcriptional program in renal epithelial progenitors. *Development* **134** 3177-3190.
- Schou M, Amdisen A, Eskjaer Jensen S & Olsen T 1968 Occurrence of goitre during lithium treatment. *Br Med J* **3** 710-713.
- Scott PH, Brunn GJ, Kohn AD, Roth RA & Lawrence JC, Jr. 1998 Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** 7772-7777.
- Shah S, Islam MN, Dakshanamurthy S, Rizvi I, Rao M, Herrell R, Zinser G, Valrance M, Aranda A, Moras D, et al. 2006 The molecular basis of vitamin D receptor and beta-catenin crossregulation. *Mol Cell* **21** 799-809.
- Shenkman L, Mitsuma T & Hollander CS 1973 Modulation of pituitary responsiveness to thyrotropin-releasing hormone by triiodothyronine. *J Clin Invest* **52** 205-209.

- Shin I, Yakes FM, Rojo F, Shin NY, Bakin AV, Baselga J & Arteaga CL 2002 PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med* **8** 1145-1152.
- Shirokawa JM, Elisei R, Knauf JA, Hara T, Wang J, Saavedra HI & Fagin JA 2000 Conditional apoptosis induced by oncogenic ras in thyroid cells. *Mol Endocrinol* **14** 1725-1738.
- Sinner D, Rankin S, Lee M & Zorn AM 2004 Sox17 and beta-catenin cooperate to regulate the transcription of endodermal genes. *Development* **131** 3069-3080.
- Sofiadis A, Becker S, Hellman U, Hultin-Rosenberg L, Dinets A, Hulchiy M, Zedenius J, Wallin G, Foukakis T, Hoog A, et al. 2012 Proteomic profiling of follicular and papillary thyroid tumors. *Eur J Endocrinol* **166** 657-667.
- Soshnikova N, Zechner D, Huelsken J, Mishina Y, Behringer RR, Taketo MM, Crenshaw EB, 3rd & Birchmeier W 2003 Genetic interaction between Wnt/beta-catenin and BMP receptor signaling during formation of the AER and the dorsal-ventral axis in the limb. *Genes Dev* **17** 1963-1968.
- Tartari CJ, Donadoni C, Manieri E, Mologni L, Mina PD, Villa A & Gambacorti-Passerini C 2011 Dissection of the RET/beta-catenin interaction in the TPC1 thyroid cancer cell line. *Am J Cancer Res* **1** 716-725.
- Tasevski V, Benn D, King M, Luttrell B & Simpson A 2000 Mitogenic effect of lithium in FRTL-5 cells can be reversed by blocking de novo cholesterol synthesis and subsequent signal transduction. *Thyroid* **10** 305-311.
- Taurin S, Sandbo N, Qin Y, Browning D & Dulin NO 2006 Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **281** 9971-9976.
- Tetsu O & McCormick F 1999 Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* **398** 422-426.
- Thomas D, Friedman S & Lin RY 2008 Thyroid stem cells: lessons from normal development and thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* **15** 51-58.
- Tian Q, Feetham MC, Tao WA, He XC, Li L, Aebersold R & Hood L 2004 Proteomic analysis identifies that 14-3-3zeta interacts with beta-catenin and facilitates its activation by Akt. *Proc Natl Acad Sci USA* **101** 15370-15375.
- Todaro M, Iovino F, Eterno V, Cammareri P, Gambarà G, Espina V, Gulotta G, Dieli F, Giordano S, De Maria R, et al. 2010 Tumorigenic and metastatic activity of human thyroid cancer stem cells. *Cancer Res* **70** 8874-8885.
- Tramontano D, Chin WW, Moses AC & Ingbar SH 1986a Thyrotropin and dibutyryl cyclic AMP increase levels of c-myc and c-fos mRNAs in cultured rat thyroid cells. *J Biol Chem* **261** 3919-3922.
- Tramontano D, Cushing GW, Moses AC & Ingbar SH 1986b Insulin-like growth factor-I stimulates the growth of rat thyroid cells in culture and synergizes the stimulation of DNA synthesis induced by TSH and Graves'-IgG. *Endocrinology* **119** 940-942.
- Trueba SS, Auge J, Mattei G, Etchevers H, Martinovic J, Czernichow P, Vekemans M, Polak M & Attie-Bitach T 2005 PAX8, TTF1, and FOXE1 gene expression patterns during human development: new insights into human thyroid development and thyroid dysgenesis-associated malformations. *J Clin Endocrinol Metab* **90** 455-462.
- Tsuzaki S & Moses AC 1990 Somatostatin inhibits deoxyribonucleic acid synthesis induced by both thyrotropin and insulin-like growth factor-I in FRTL5 cells. *Endocrinology* **126** 3131-3138.
- Tzelepi VN, Tsamandas AC, Vlotinou HD, Vagianos CE & Scopa CD 2008 Tight junctions in thyroid carcinogenesis: diverse expression of claudin-1, claudin-4, claudin-7 and occludin in thyroid neoplasms. *Mod Pathol* **21** 22-30.
- Valenta T, Hausmann G & Basler K 2012 The many faces and functions of beta-catenin. *EMBO J* **31** 2714-2736.
- Van Keymeulen A, Bartek J, Dumont JE & Roger PP 1999 Cyclin D3 accumulation and activity integrate and rank the comitogenic pathways of thyrotropin and insulin in thyrocytes in primary culture. *Oncogene* **18** 7351-7359.

- Van Noorden S, Polak JM & Pearse AG 1977 Single cellular origin of somatostatin and calcitonin in the rat thyroid gland. *Histochemistry* **53** 243-247.
- Van Renterghem P, Dremier S, Vassart G & Christophe D 1995 Study of TTF-1 gene expression in dog thyrocytes in primary culture. *Mol Cell Endocrinol* **112** 83-93.
- van Veelen W, Le NH, Helvensteijn W, Blondin L, Theeuwes M, Bakker ER, Franken PF, van Gurp L, Meijlink F, van der Valk MA, et al. 2011 beta-catenin tyrosine 654 phosphorylation increases Wnt signalling and intestinal tumorigenesis. *Gut* **60** 1204-1212.
- Vandeput F, Perpete S, Coulonval K, Lamy F & Dumont JE 2003 Role of the different mitogen-activated protein kinase subfamilies in the stimulation of dog and human thyroid epithelial cell proliferation by cyclic adenosine 5'-monophosphate and growth factors. *Endocrinology* **144** 1341-1349.
- Vasko V, Saji M, Hardy E, Kruhlak M, Larin A, Savchenko V, Miyakawa M, Isozaki O, Murakami H, Tsushima T, et al. 2004 Akt activation and localisation correlate with tumour invasion and oncogene expression in thyroid cancer. *J Med Genet* **41** 161-170.
- Vassart G & Dumont JE 1992 The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocr Rev* **13** 596-611.
- Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, et al. 2004 In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* **303** 844-848.
- Veeman MT, Axelrod JD & Moon RT 2003 A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell* **5** 367-377.
- Velasco JA, Acebron A, Zannini M, Martin-Perez J, Di Lauro R & Santisteban P 1998 Ha-ras interference with thyroid cell differentiation is associated with a down-regulation of thyroid transcription factor-1 phosphorylation. *Endocrinology* **139** 2796-2802.
- Vermeulen L, De Sousa EMF, van der Heijden M, Cameron K, de Jong JH, Borovski T, Tuynman JB, Todaro M, Merz C, Rodermond H, et al. 2010 Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol* **12** 468-476.
- Vilain C, Rydlewski C, Duprez L, Heinrichs C, Abramowicz M, Malvaux P, Renneboog B, Parma J, Costagliola S & Vassart G 2001 Autosomal dominant transmission of congenital thyroid hypoplasia due to loss-of-function mutation of PAX8. *J Clin Endocrinol Metab* **86** 234-238.
- Vizioli MG, Possik PA, Tarantino E, Meissl K, Borrello MG, Miranda C, Anania MC, Pagliardini S, Seregini E, Pierotti MA, et al. 2011 Evidence of oncogene-induced senescence in thyroid carcinogenesis. *Endocr Relat Cancer* **18** 743-757.
- Vuchak LA, Tsygankova OM, Prendergast GV & Meinkoth JL 2009 Protein kinase A and B-Raf mediate extracellular signal-regulated kinase activation by thyrotropin. *Mol Pharmacol* **76** 1123-1129.
- Wada H & Okamoto H 2009 Roles of planar cell polarity pathway genes for neural migration and differentiation. *Dev Growth Differ* **51** 233-240.
- Wels C, Joshi S, Koefinger P, Bergler H & Schaidt H 2011 Transcriptional activation of ZEB1 by Slug leads to cooperative regulation of the epithelial-mesenchymal transition-like phenotype in melanoma. *J Invest Dermatol* **131** 1877-1885.
- Woloshin PI, Walton KM, Rehfuess RP, Goodman RH & Cone RD 1992 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-regulated enhancer binding (CREB) activity is required for normal growth and differentiated phenotype in the FRTL5 thyroid follicular cell line. *Mol Endocrinol* **6** 1725-1733.
- Wong MH, Rubinfeld B & Gordon JI 1998 Effects of forced expression of an NH2-terminal truncated beta-Catenin on mouse intestinal epithelial homeostasis. *J Cell Biol* **141** 765-777.
- Wu B, Crampton SP & Hughes CC 2007a Wnt signaling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration. *Immunity* **26** 227-239.
- Wu CH, van Riggelen J, Yetil A, Fan AC, Bachireddy P & Felsner DW 2007b Cellular senescence is an important mechanism of tumor regression upon c-Myc inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104** 13028-13033.

- Xing M 2010 Genetic alterations in the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Thyroid* **20** 697-706.
- Xing Y, Takemaru K, Liu J, Berndt JD, Zheng JJ, Moon RT & Xu W 2008 Crystal structure of a full-length beta-catenin. *Structure* **16** 478-487.
- Xu X, Quiros RM, Gattuso P, Ain KB & Prinz RA 2003 High prevalence of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinomas and thyroid tumor cell lines. *Cancer Res* **63** 4561-4567.
- Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V, Cordon-Cardo C & Lowe SW 2007 Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* **445** 656-660.
- Ye X, Zerlanko B, Kennedy A, Banumathy G, Zhang R & Adams PD 2007 Downregulation of Wnt signaling is a trigger for formation of facultative heterochromatin and onset of cell senescence in primary human cells. *Mol Cell* **27** 183-196.
- Yoshida A, Saito K, Endo Y, Mori K, Seki M & Takebe H 2004 [Thyroid uptake error in four different gamma camera systems]. *Nihon Hoshasen Gijutsu Gakkai Zasshi* **60** 387-392.
- Zaballos MA, Garcia B & Santisteban P 2008 Gbetagamma dimers released in response to thyrotropin activate phosphoinositide 3-kinase and regulate gene expression in thyroid cells. *Mol Endocrinol* **22** 1183-1199.
- Zaballos MA & Santisteban P 2013 FOXO1 Controls Thyroid Cell Proliferation in Response to TSH and IGF-I and Is Involved in Thyroid Tumorigenesis. *Mol Endocrinol*.
- Zannini M, Francis-Lang H, Plachov D & Di Lauro R 1992 Pax-8, a paired domain-containing protein, binds to a sequence overlapping the recognition site of a homeodomain and activates transcription from two thyroid-specific promoters. *Mol Cell Biol* **12** 4230-4241.
- Zechner D, Fujita Y, Hulsken J, Muller T, Walther I, Taketo MM, Crenshaw EB, 3rd, Birchmeier W & Birchmeier C 2003 beta-Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system. *Dev Biol* **258** 406-418.
- Zeng X, Tamai K, Doble B, Li S, Huang H, Habas R, Okamura H, Woodgett J & He X 2005 A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* **438** 873-877.
- Zhang J, Gill AJ, Issacs JD, Atmore B, Johns A, Delbridge LW, Lai R & McMullen TP 2011 The Wnt/beta-catenin pathway drives increased cyclin D1 levels in lymph node metastasis in papillary thyroid cancer. *Hum Pathol*.
- Zhu G, Wang Y, Huang B, Liang J, Ding Y, Xu A & Wu W 2012 A Rac1/PAK1 cascade controls beta-catenin activation in colon cancer cells. *Oncogene* **31** 1001-1012.

ANEXO I: PUBLICACIONES RELACIONADAS





Role of the Wnt pathway in thyroid cancer

Ana Sastre-Perona and Pilar Santisteban*

Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols," Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

Edited by:

Carmelo Nucera, Beth Israel
Deaconess Medical Center/Harvard
Medical School, USA

Reviewed by:

Ettore Ciro Degli Uberti, University of
Ferrara, Italy

Roberta Malaguamera, University
"Magna Graecia" of Catanzaro, Italy
Marialuisa Appetecchia, Regina Elena
National Cancer Institute IRCCS, Italy

*Correspondence:

Pilar Santisteban, Instituto de
Investigaciones Biomédicas, Consejo
Superior de Investigaciones
Científicas, y Universidad Autónoma
de Madrid, C/Arturo Duperier 4,
28029 Madrid, Spain.
e-mail: psantisteban@iib.uam.es

Aberrant activation of Wnt signaling is involved in the development of several epithelial tumors. Wnt signaling includes two major types of pathways: (i) the canonical or Wnt/ β -catenin pathway; and (ii) the non-canonical pathways, which do not involve β -catenin stabilization. Among these pathways, the Wnt/ β -catenin pathway has received most attention during the past years for its critical role in cancer. A number of publications emphasize the role of the Wnt/ β -catenin pathway in thyroid cancer. This pathway plays a crucial role in development and epithelial renewal, and components such as β -catenin and Axin are often mutated in thyroid cancer. Although it is accepted that altered Wnt signaling is a late event in thyroid cell transformation that affects anaplastic thyroid tumors, recent data suggest that it is also altered in papillary thyroid carcinoma (PTC) with RET/PTC mutations. Therefore, the purpose of this review is to summarize the main relevant data of Wnt signaling in thyroid cancer, with special emphasis on the Wnt/ β -catenin pathway.

Keywords: Wnt pathway, signaling network, thyroid cancer, proliferation, differentiation

INTRODUCTION

Follicular epithelial thyroid carcinoma is the most common endocrine malignancy, and its incidence is rapidly rising in the world. Although thyroid cancer has a very good outcome, there are still several challenges that classical clinicopathological studies have not been able to resolve (Riesco-Eizaguirre and Santisteban, 2007). The most recent advances in thyroid cancer research derive from an increased understanding of the mechanisms that regulate thyroid cell differentiation and proliferation and the signal transduction pathways involved.

Differentiated thyroid cells form follicular structures surrounding a lumen and express a series of thyroid-specific transcription factors as well as other specific proteins (reviewed in De Felice and Di Lauro, 2004; Santisteban and Bernal, 2005). Thyroid proliferation and differentiation are finely regulated by Thyrotropin (thyroid stimulating hormone, TSH) that, after binding to its receptor (TSHR, a seven-transmembrane receptor coupling to G proteins), activates the cAMP/PKA cascade (Vassart and Dumont, 1992). Recently our group has shown that TSH can also act via PI3K/Akt (Zaballos et al., 2008). In addition, increasing evidence supports a role for other kinases, such as MAP kinase (MAPK), which are activated in response to TSH and lie downstream of cAMP (Dumaz and Marais, 2005).

The differentiated thyroid epithelial phenotype is characterized by structural and functional polarization of the cell surface into apical and basolateral domains, and the formation of junction complexes that mediate strong and tight intercellular adhesion. Cell polarization plays a central role in maintaining follicular structures and its alteration occurs in parallel with cell transformation. The presence of tight junctions in thyroid epithelial cells

is thought to be essential for the integrity and maintenance of the follicular structure. Several molecules are involved in this process; of these, the occludins, claudins, and zonula occludens (ZO) proteins have been most intensively studied, as they play an important role in the maintenance of the epithelial cell phenotype. As occurs with others epithelial markers, their expression is reduced in thyroid cancer progression (Tzelepi et al., 2008). On the other hand, adherens junctions are mainly composed of cadherins. Among them, E-cadherin and Cadherin 16 are highly expressed in the thyroid (Cali et al., 2012). Both are members of the large superfamily of adhesion molecules and play a critical role in the establishment of cell polarity and firm contacts.

Adherens junctions have a similar structural organization as tight junctions: E-cadherins and Cadherin 16 form contacts with the catenins (α , β , and γ) and α B-crystallin respectively, and these latter proteins connect with the cytoskeleton (Cali et al., 2012). The follicular structure is maintained by a series of proteins through which TSH and intercellular contact regulate adhesion of follicular cells to each other and to the extracellular matrix, and influence thyroid cell behavior. The extracellular matrix plays a role in the adhesion, proliferation, differentiation, and migration of thyroid follicular cells.

It has been reported that downregulation of cadherins takes place in carcinogenesis and is associated with tumor progression in a variety of human carcinomas (Strumane et al., 2004; Berx and van Roy, 2009). Therefore, decreased expression or loss of cadherins may lead to the development of epithelial tumors, invasion, and metastasis. In accordance with this, the loss of E-cadherin and Cadherin 16 expression in thyroid carcinoma has been correlated with a loss of differentiation and a poor prognosis (Brabant et al., 1993; Cali et al., 2012; de Cristofaro et al., 2012).

THYROID CANCER INITIATION AND PROGRESSION

Thyroid cell proliferation requires the combined effects of TSH, acting via cAMP, and growth factors such as IGF1, signaling primarily through MAPK and phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K; Medina and Santisteban, 2000; Kimura et al., 2001). It is therefore well accepted that mutations in genes involved in these signaling pathways play prominent roles in the pathogenesis of thyroid neoplasia.

Currently there are two hypotheses to explain the onset of thyroid cancer, the classical multistep model and a theory based on cancer stem cells (CSCs).

The classical view considers thyroid carcinoma as a complication of a pre-existing follicular adenoma (FA) accumulating mutations that drive progression through a dedifferentiation process. Accordingly, a step model of thyroid carcinogenesis involving different defined types of thyroid tumor is well accepted (Figure 1). Thus, autonomously hyperfunctioning thyroid adenomas and FAs are benign tumors that rarely progress to malignancy. Papillary thyroid carcinoma (PTC) and follicular thyroid carcinoma (FTC) show follicular cell differentiation, and poorly differentiated carcinomas (PDC) have morphological and biological characteristics intermediate between well-differentiated and undifferentiated (anaplastic) thyroid carcinomas (ATC; reviewed in Riesco-Eizaguirre and Santisteban, 2007, and in Nikiforov and Nikiforova, 2011).

The genetic events involved in tumor initiation have been identified in well-differentiated thyroid cancer. In PTC there are many data supporting a central role of mutations leading to constitutive activation of the MAPK pathway. Thus, the V600E mutation of BRAF, RET/PTC rearrangements, and RAS mutations have been clearly implicated in the pathogenesis of this disease. These three pathways are mutually exclusive and it is accepted that they are the cause of a significant proportion of PTCs. Similarly, there is increasing evidence that shows that cancer genes acting through

the PI3K pathway (*PI3KCA* and *PTEN*) are involved in the pathogenesis of FTC. However, in this case more studies are needed to elucidate a possible causal effect of these genetic events. Furthermore, a PAX8/PPAR γ rearrangement (Kroll et al., 2000) has been identified in a significant proportion of these tumors, although the mechanism of transformation induced by PAX8/PPAR γ is still unclear.

Deregulation of the p53 pathway seems to be an important second step leading to the progression of PDC/ATC (Fagin et al., 1993; Figures 1 and 2). In addition, activating mutations in the β -catenin gene (*CTNNB1*) have been described in ATC that occur late in thyroid tumor progression. Therefore, until the recent demonstration that RET/PTC stimulates the β -catenin pathway in the thyroid (Cassinelli et al., 2009; Castellone et al., 2009; Tartari et al., 2011), it was believed that β -catenin was not involved in thyroid tumor initiation. Compared with the well-documented RAS/RAF/MAPK pathway, the β -catenin signal in thyroid cancer is less well understood, and therefore in this review we will focus on updating the existing data and comment on future directions of research.

Recently, a new theory on the cancer initiation process was formulated, based on the existence of CSCs (Thomas et al., 2008; Lin, 2011). These CSCs are a small subpopulation (between 1 and 3.5%) of the cells with stem cell-like properties such as colony formation, self-renewal, and *in vitro* resistance to chemotherapy-induced apoptosis (Dick, 2008, 2009). In the case of the thyroid gland, the CSCs would derive from thyroid embryonic stem cells, intermediates in the differentiation pathway of thyroblasts or prothyrocytes, and accumulate mutations that lead to carcinogenesis. The CSC hypothesis assumes the presence of a hierarchy of embryonic cells in the thyroid gland that can give rise to different forms of thyroid cancer (reviewed in Lu et al., 2011).

The existence of CSCs in the thyroid is still a matter of controversy, but several lines of evidence support the model. Among them is the observation that it is uncommon that a benign adenoma

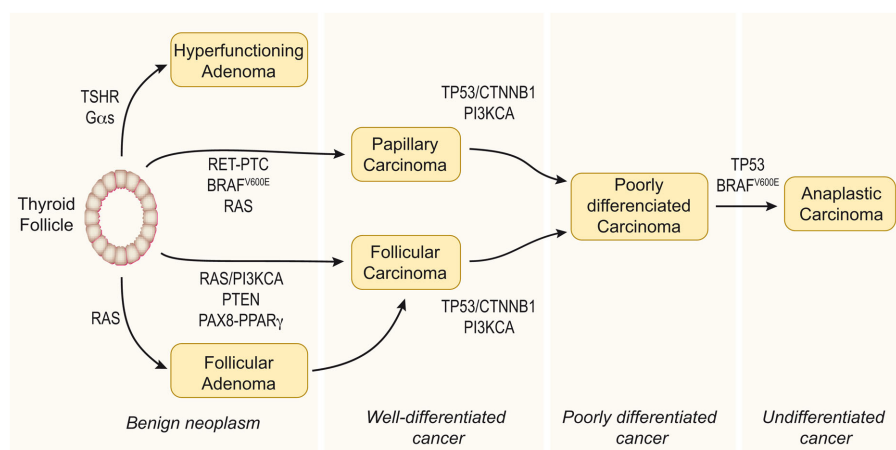


FIGURE 1 | Step model of thyroid carcinogenesis. This model is based on histological and clinical features as well as on the degree of tumor differentiation. The well-differentiated thyroid follicular cell may give rise to both benign and malignant tumors. Autonomously hyperfunctioning thyroid adenomas are associated with activating mutations in the *TSHR* or *Gαs* genes (O'Sullivan et al., 1991; Parma

et al., 1993). After gaining mutations in different oncogenes and tumor suppressor genes, the differentiated thyroid follicle can also give rise to well-differentiated papillary or follicular carcinomas, poorly differentiated carcinoma, and anaplastic carcinoma. The figure represents a schematic model showing the molecular events involved. Modified from Nikiforov and Nikiforova (2011).

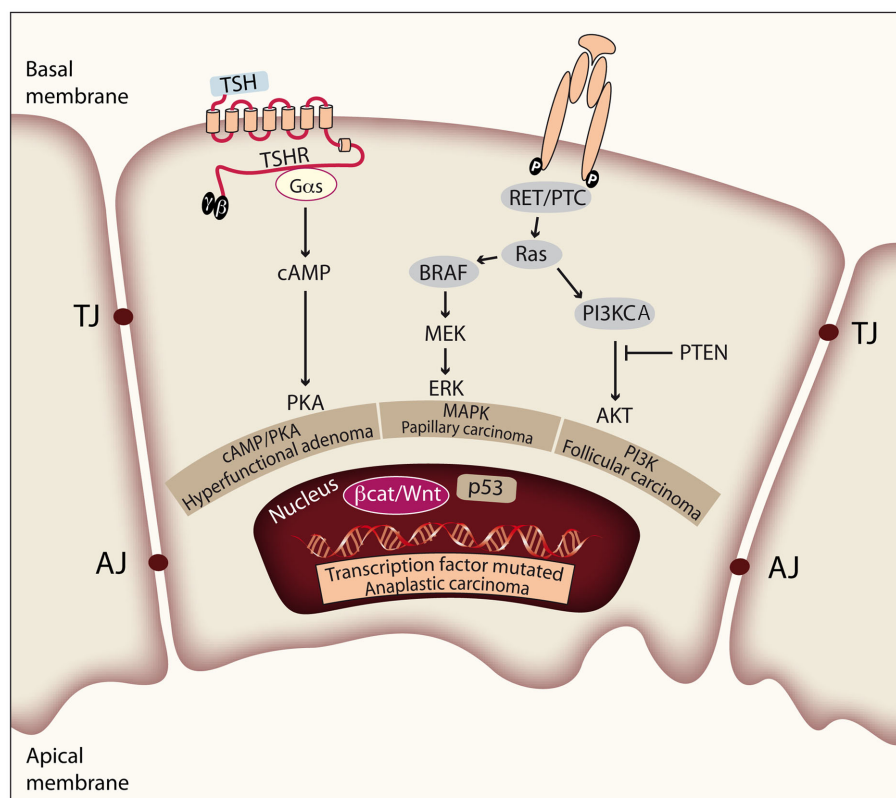


FIGURE 2 | Genetic events involved in thyroid tumor initiation and progression. Thyroid cell proliferation depends on the combined activation of cAMP/PKA, MAPK, and PI3K pathways, induced by TSH and other growth factors. Mutations of effectors along these signaling pathways play prominent roles in the pathogenesis of thyroid neoplasia. The figure represents a thyroid epithelial cell with the basal and apical membrane, and shows the tight and adherens junctions (TJ and AJ) between cells in order to

form follicular structures. Activating mutations in *TSHR* or *Gαs* lead to constitutive activation of the cAMP/PKA pathway and give rise to hyperfunctional adenomas. There is evidence that constitutive activation of the MAPK pathway is required for PTC initiation. Activation of the PI3K/Akt pathway is required for FTC initiation. Finally, deregulation of the p53 pathway and the Wnt/β-catenin pathway is observed in ATC and has more to do with tumor progression.

evolves toward carcinoma; at present, it seems that most thyroid carcinomas are malignant from the onset; the original *RET/PTC* mutations seen in FTC and PTC are hardly seen in ATC. In addition, data from Chernobyl irradiation studies, in which the highest incidence of papillary thyroid cancer was among children rather than adults, strongly support the CSC theory. The establishment of ES cell cultures able to differentiate into thyrocytes may help clarifying these views (Arufe et al., 2006).

Wnt SIGNALING

Wnt proteins are a family of highly conserved secreted cysteine-rich glycoproteins, encoded by 19 genes in humans and 18 genes in mice. These proteins play important roles in embryonic development by controlling cell proliferation, cell fate specification, tissue patterning, and cell polarity. In adults, they contribute to tissue homeostasis by controlling proliferation, stem cell activation, and self-renewal. Signaling by Wnt proteins activates three different pathways: one canonical or β-catenin-dependent pathway and two non-canonical or β-catenin-independent pathways: Wnt/ Ca^{2+} and planar cell polarity (PCP; **Figure 3**). The relevance of these pathways is also reflected by the fact that mutations in some elements of the Wnt pathways are often linked to human

diseases like leukemia and other cancers, and type-II diabetes (Kikuchi and Yamamoto, 2008; MacDonald et al., 2009).

CANONICAL Wnt/β-CATENIN PATHWAY

The most extensively studied Wnt pathway is the Wnt/β-catenin pathway, due to its important role in cancer initiation and progression (Reya and Clevers, 2005; see **Figure 3**, left). In the absence of Wnt, β-catenin, the central component of the pathway, is localized in adherens junctions bound to E-cadherin. The unbound cytoplasmic protein is constantly degraded by a protein complex called destruction complex, which is composed of the scaffold proteins Axin and adenomatous polyposis coli (APC), and the kinases casein kinase 1 (CK1) and glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3β; Rubinfeld et al., 1996). CK1 and GSK3β sequentially phosphorylate β-catenin, resulting in β-catenin being recognized and ubiquitinated by the β-Trcp ubiquitin ligase, followed by proteasomal degradation. With low levels of free cytoplasmic β-catenin, the transcription factors T-cell factor/lymphoid enhancer factors (TCF/LEF) function as transcriptional repressors by recruiting corepressors of the TLE/Groucho family.

The Wnt pathway is activated when a protein of the family, such as Wnt1, Wnt3, Wnt3a, Wnt7A, or Wnt10B, binds

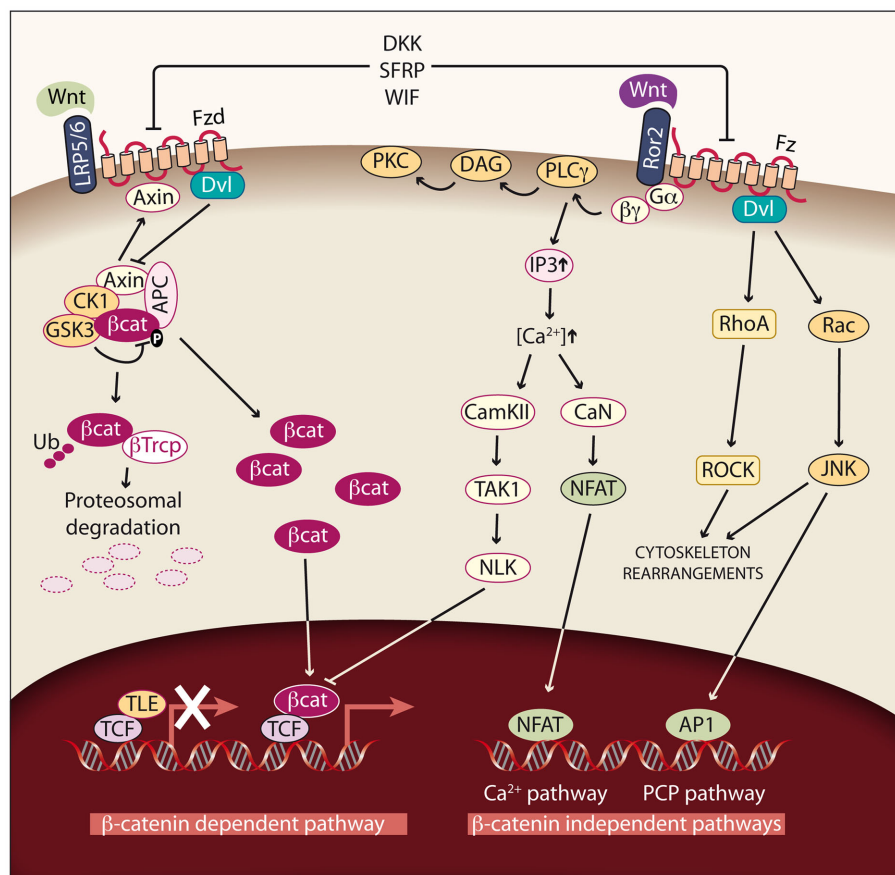


FIGURE 3 | Wnt signaling pathways. *Left:* Canonical or Wnt/ β -catenin dependent pathway. In cells not exposed to Wnt factors, cytoplasmic β -catenin is degraded, and TLE/Groucho proteins repress its target genes. If Wnt signaling is activated by binding of Wnt factors such as Wnt1, Wnt3, Wnt3A, Wnt7A, or Wnt10B to the Fzd receptor and LRP5/6 coreceptors, β -catenin degradation is reduced and the protein accumulates in the cytoplasm. As a consequence, β -catenin enters the nucleus, binds to TCF/LEF transcription factors and activates transcription. In this way, different processes such as proliferation are modulated. *Right:*

Non-canonical or β -catenin-independent pathways. Binding of the non-canonical Wnt factors Wnt4, Wnt11, or Wnt5A to different Fzd receptors and the Ror2 coreceptor transduce signaling by two different pathways. The Ca^{2+} pathway promotes the activation of protein kinase C (PKC) via G-PLC γ and modulates cell adhesion and motility by activating calcium-calmodulin kinase (CamKII), and the phosphatase calcineurin (CaN). The planar cell polarity (PCP) pathway modulates cytoskeleton rearrangements through the activation of the small GTPases RhoA and Rac and their downstream effectors Rock and JNK.

to a frizzled receptor (Fzd) and the LDL-Receptor-related protein coreceptor (LRP5/6). Formation of a Wnt–Fzd–LRP complex induces the binding of the cytoplasmic protein Disheveled (Dvl) to Fzd and the LRP phosphorylation-dependent recruitment of Axin to the membrane. Recruitment of Axin, which is the limiting component of the destruction complex, promotes the release of β -catenin, and its accumulation in cytoplasm and nuclei. In the nuclei, β -catenin displaces TLE/Groucho corepressors and recruits coactivators, activating expression of Wnt target genes. The meanings of the acronyms used for the different members of the Wnt pathway are given in **Table 1**; see <http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/> for more details.

The most important genes regulated are those related to proliferation, such as *Cyclin D1* and *c-Myc* (He et al., 1998; Tetsu and McCormick, 1999), which are over-expressed in most β -catenin-dependent tumors.

NON-CANONICAL Wnt PATHWAYS

There are two main β -catenin-independent pathways (see **Figure 3**, right). The activation of these pathways is mediated by Wnt factors such as Wnt4, Wnt11, and Wnt5A in a tissue and context specific way. The first pathway is the PCP pathway. This pathway can be triggered through several of the Fzd receptors and it activates the small GTP-binding proteins RhoA and Rac and their downstream effectors Rho-kinase and JNK. This non-canonical pathway is involved in tissue polarity, cell migration, and cytoskeleton organization. It has been described in *Drosophila*, and although its relevance in mammals has not been fully demonstrated, there is important evidence pointing to its existence in these vertebrates (Wada and Okamoto, 2009). The second pathway is the Ca^{2+} pathway, which can be activated by the interaction with two Fzd receptors (Fzd 2 and 7) or with Ror2 (receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2). The activation of this pathway leads to an activation of PKC and to increased intracellular Ca^{2+} levels,

Table 1 | Members of the Wnt pathway grouped according to function.

β -Catenin destruction complex	APC1/2 (adenomatous polyposis coli) Axin 1/2 GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 beta) CK1 (casein kinase 1)	
Receptor/co-receptors	Fzd 1–10 (frizzled) LRP5/6 (LDL receptor related protein) co-receptor Ror2 (receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2) Dvl 1–3 (dishevelled: cytoplasmic protein downstream of Fzd receptors)	
Wnt ligands	β -catenin-dependent pathway activators	Wnt1, 2, 2B, 3, 3A, 6, 5B, 7A, 7B, 8A, 8B, 9A, 9B, 10A, 10B, 16
	β -catenin-independent pathways activators	Wnt4, 5A, and 11
Transcription factors	TCF1, 3, and 4; Lef1 (T-cell factors; lymphoid enhancer factor)	
Transcriptional co-activators	β -catenin	
Transcriptional co-repressors	TLE (transducin-like enhancer of split)/Groucho 1–4	
Wnt inhibitors	DKK 1–4 (dickkopf) SFRP 1–5 (secreted frizzled-related proteins) Soggy and WIF	

which activates CaMKII and calcineurin (CaN) and regulates cell migration and proliferation (Nishita et al., 2010).

Wnt INHIBITORS

Activation of the Wnt pathway is highly regulated, and there are two families of antagonists: DKK and secreted frizzled-related proteins (SFRP). The Dickkopf (DKK) family is a group of four soluble proteins that bind to LRP and thus prevent the formation of the Wnt–Fzd complex. The SFRP are soluble glycoproteins that inhibit the Wnt pathway by sequestering Wnt proteins, thus preventing their interaction with Fzd receptors. There are other Wnt inhibitors like WIF or Soggy1 (Filipovich et al., 2011; **Figure 3**). The physiological role of these proteins is to inhibit the Wnt pathway in a time and tissue-specific manner both during development and in adult tissues. The silencing of *DKK* and *SFRP* genes has been described in several tumor types, contributing to the activation of the canonical pathway (Aguilera et al., 2006).

Wnt AND THYROID CANCER

Normal thyroid cells express several Fzd, Dvl, and Wnt proteins and have a functional destruction complex (Helmbrecht et al., 2001). In addition, TSH-dependent over-expression of Wnt1 (Kim et al., 2007) and inhibition of GSK3 β by adenoviral-interference (Chen et al., 2010) lead to an increase of rat and human thyroid cell proliferation. These data suggest the existence of a functional Wnt pathway, relevant for the proliferation of thyroid cells.

Given the hypothetical role of this pathway in proliferation, it is not surprising that over-activation of the Wnt/ β -catenin pathway promotes tumor growth in the thyroid, as in other Wnt-dependent tissues like skin or colon.

Classically, activation of the Wnt pathway in thyroid cancer has been related with ATCs, as a second mutational event involved in the progression from a well-differentiated to a poorly or undifferentiated (anaplastic) and more aggressive thyroid carcinoma. However, as commented above, recent data correlate this pathway also with early stages of thyroid carcinogenesis.

Wnt IN POORLY DIFFERENTIATED AND ANAPLASTIC THYROID CARCINOMA

Mutations of several components of the Wnt pathway have been described in ATC (**Table 2**). The most frequent mutations are those in the scaffold proteins APC and Axin, as well as in β -catenin (Polakis, 2007). In tumors such as colon tumors mutations most frequently affect the *APC* gene, but in the thyroid the mutations appear mainly in β -catenin and Axin.

In ATC, three different studies found nuclear localization of β -catenin in 40–60% of the samples analyzed, highlighting the role of the Wnt pathway in this type of tumor (Garcia-Rostan et al., 1999, 2001; Kurihara et al., 2004). In these studies, performed in three different human populations, mutations in the *β -catenin* and *Axin1* genes were described. In two of them, all β -catenin mutations found were in the conserved Ser and Thr residues phosphorylated by CK1 and GSK3 β , which results in a constitutive stabilization of the protein and successive accumulation in both cytoplasm and nucleus. The presence of nuclear β -catenin correlated with a higher proliferation and a loss of tumor differentiation, and therefore with a poor prognosis (Garcia-Rostan et al., 1999, 2001). Despite the role of β -catenin in proliferation, these latter two studies together with another one (Cerrato et al., 1998) also described a percentage of anaplastic tumors in which the β -catenin expression is absent.

These data can be interpreted to mean that there are distinct subtypes of tumors in ATC with different, mutually exclusive mutations. Thus, one subtype would carry the Wnt/ β -catenin pathway mutation, while the other would carry the p53 mutation (Fagin et al., 1993) or an activated PI3K/Akt pathway, e.g., through a mutation in *PI3KCA* (Garcia-Rostan et al., 2005); these three are the most frequent mutations found in ATC. It would be of great interest to establish whether mutations in oncogenes or tumor suppressor genes are mutually exclusive in order to better classify anaplastic thyroid tumors.

By contrast, the study by Kurihara et al. (2004) described a low percentage of β -catenin mutations, while more than 50% of the tumors carried mutations in the functional domain of Axin1. The different mutations found in the *Axin1* gene affect the domains for interaction with APC, β -catenin and Dvl, and the G-protein regulatory domain, and thus affect the role of Axin as a negative regulator of β -catenin. The difference in data regarding β -catenin and Axin mutations may be due to the different genetic backgrounds of the populations analyzed.

Wnt IN WELL-DIFFERENTIATED THYROID CARCINOMA

It is well accepted that there is a correlation between the subcellular localization of β -catenin and cancer progression (Garcia-Rostan et al., 2001). In hyperfunctioning adenomas and FTC, β -catenin is localized in the plasma membrane, as it is in the normal thyroid gland. In PTC, there is an accumulation of β -catenin in the cytoplasm, and in poorly and undifferentiated carcinoma β -catenin is translocated to the nuclei due to mutations in the *β -catenin*

gene as well as in other genes of the Wnt pathway (Table 3). We already discussed the role of β -catenin in ATC, but the role and the molecular mechanisms that lead to the cytoplasmic stabilization of β -catenin have not been established. Some groups have correlated cytoplasmic β -catenin in PTC with higher levels of cyclin D1 (Ishigaki et al., 2002; Meirmanov et al., 2003; Rezk et al., 2004; Zhang et al., 2011) and increased proliferation. Nevertheless, at present there are no *in vitro* results that corroborate this hypothesis and no relationship between cytoplasmic β -catenin and transcriptional activity has been found. More studies are needed to demonstrate a direct link between cytoplasmic β -catenin and cyclin D1 expression in order to correlate both events with proliferation.

E-cadherin is a transmembrane protein that mediates cell–cell adhesion in a Ca^{2+} -dependent manner. It interacts through its cytoplasmic domain with β -catenin and the actin cytoskeleton, controlling cell migration and cell polarity (Hulsken et al., 1994). In normal thyroid cells, E-cadherin is expressed in the basolateral

Table 2 | Events linked with aberrant activation of Wnt signaling in thyroid cancer.

Gene	Mutation or activity/expression	Tumor	No. of cases	Reference
<i>CTNNB1</i> *	GOF	ATC	19/31	Garcia-Rostan et al. (1999)
		ATC (PD)	7/28	Garcia-Rostan et al. (2001)
		ATC (UD)	19/29	Garcia-Rostan et al. (2001)
<i>Axin 1</i>	LOF	ATC	18/22	Kurihara et al. (2004)
<i>APC</i>	LOF	CMV–PTC	4/4	Cetta et al. (1998)
			15/15	Cetta et al. (2000)
<i>Wnt5A</i>	Elevated	FTC/PTC	8/8–10/11	Kremenevskaja et al. (2005)
<i>Wnt5A</i>	Reduced	ATC	5/5	Kremenevskaja et al. (2005)

* β -catenin gene; GOF, gain of function; LOF, loss of function; FTC, follicular thyroid carcinoma; PTC, papillary thyroid carcinoma; ATC, anaplastic thyroid carcinoma; PD, poorly differentiated; UD, un-differentiated; CMV–PTC, cribriform–mucinous variant of PTC.

Table 3 | Localization of β -catenin in thyroid carcinoma.

Tumor type	Cytoplasmic expression	Nuclear expression	No. of cases	Reference
FA	3 (9%)		34	Ishigaki et al. (2002)
	3 (37.5%)		8	Meirmanov et al. (2003)
FTC	5 (25%)		20	Ishigaki et al. (2002)
	8 (80%)		10	Rezk et al. (2004)
	8 (60%)		12	Garcia-Rostan et al. (2001)
PTC	46 (100%)		46	Garcia-Rostan et al. (2001)
	46 (87%)		53	Rezk et al. (2004)
	52 (67%)		78	Ishigaki et al. (2002)
	23 (100%)		23	Meirmanov et al. (2003)
FVPTC	33 (71%)		46	Garcia-Rostan et al. (2001)
ATC (PD)		6 (24.1%)	28	Garcia-Rostan et al. (2001)
ATC (UD)		14 (48.3)	29	Garcia-Rostan et al. (2001)
ATC		15 (41%)	36	Garcia-Rostan et al. (1999)
	10 (49%)	14 (63.6%)	22	Kurihara et al. (2004)

FA, follicular adenoma; FVPTC, follicular variant of PTC; the other acronyms of tumor type as defined in Table 2.

membrane and its downregulation, by promoter methylation or by activation of oncogenes such as *BRAF*, has been implicated in the induction of the epithelial mesenchymal transition (EMT) in follicular, papillary, and anaplastic thyroid tumor cells (Brabant et al., 1993; Graff et al., 1998; Riesco-Eizaguirre et al., 2009). As E-cadherin keeps β -catenin bound to the cell membrane, the presence of cytoplasmic β -catenin could be merely a consequence of the loss of E-cadherin expression, although this correlation has not yet been demonstrated.

Supporting the role of β -catenin in earlier stages of tumor progression, recent publications describe the involvement of β -catenin in RET/PTC-induced proliferation (Cassinelli et al., 2009; Castellone et al., 2009; Tartari et al., 2011). These studies show a RET/PTC-dependent stabilization of β -catenin by phosphorylation of a residue outside the GSK3 β Ser/Thr domain. This stabilization, together with an Akt–MAPK-dependent inhibition of GSK3 β , leads to an increase of β -catenin in the nuclei where it is able to interact with the transcription factors TCF/LEF and CREB binding to the *cyclin D1* promoter. In consequence, DNA synthesis and cell proliferation are induced. This is another way of Wnt/ β -catenin pathway regulation, by post-translational modifications, that points to a participation of this pathway in the first steps of thyroid cell transformation. Unfortunately, the authors did not correlate their results with the localization of β -catenin in RET/PTC-carrying thyroid tumors.

Data obtained from the TR $\beta^{PV/PV}$ mouse model of FTC that harbors a dominant negative mutation (PV) of the thyroid hormone-beta receptor (TR β), also support the notion that β -catenin could contribute to thyroid carcinogenesis (Guigon et al., 2008; Lu et al., 2011). Thus, in the FTC tumors of these mice thyroid hormone and its receptors seem to modulate the Wnt/ β -catenin pathways in two ways. First, the TR β acts as negative regulator of β -catenin in a T3-dependent manner (Guigon et al., 2008). In the absence of ligand, TR β binds to β -catenin and stabilizes it in the cytoplasm and the nuclei allowing β -catenin to operate as a transcriptional activator promoting cell proliferation. Binding of T3 to TR β weakens the physical interaction between β -catenin and TR β and allows the uncomplexed β -catenin to be targeted for proteasomal degradation. In the thyroid tumors developed in the transgenic TR $\beta^{PV/PV}$ mice, β -catenin is constitutively stabilized through its binding to the mutant TR β , because the mutated TR β cannot bind T3. In this way, β -catenin activates the expression of its target genes *cyclin D1*, *myc*, and *MT1-MMP* (matrix metalloproteinase), and promotes tumor growth and progression. The second mechanism involves a non-genomic action: T3 (elevated in the TR $\beta^{PV/PV}$ mice) is able to increase the PTEN/PI3K/Akt pathway through the $\alpha\beta 3$ receptor, leading to the phosphorylation of β -catenin, which increases its stability and transcriptional activity and promotes cell proliferation (Lu et al., 2011). Overall, these results show a new mechanism of activation of the Wnt/ β -catenin pathway, which through the stabilization of β -catenin could be promoting cancer progression in the thyroid gland.

All the above evidence points to a role of β -catenin in well-differentiated thyroid carcinomas, but more *in vitro* and *in vivo* evidence is needed and the molecular mechanism remains to be resolved.

NON-CANONICAL Wnt PATHWAYS IN THYROID CARCINOMAS

Wnt5A is an activator of the non-canonical Wnt pathways. Due to its roles in planar polarity and cell migration and invasiveness, Wnt5A has been implicated in several human cancers, but, as occurs in normal tissues, the roles of Wnt5A in cancer are tissue and receptor specific. In osteosarcoma as well as in prostate and renal cell carcinomas, Wnt5A acting through the Ror2 receptor is involved in matrix metalloprotease expression, enhancing cell migration and invasiveness of these cells, and consequently it is a poor prognosis factor for these types of tumors. By contrast, in colon and thyroid tumors Wnt5A acts as a tumor suppressor, highlighting the variety of roles of this Wnt member (McDonald and Silver, 2009).

While Wnt5A is expressed in FA, PTC, and FTC, no expression has been detected in ATC or in the normal thyroid (Kremenevskaja et al., 2005). In well-differentiated cancer cells, Wnt5A acts as a tumor suppressor by inhibiting both Wnt/ β -catenin-dependent proliferation in a Ca²⁺/CaMKII dependent manner, and migration and invasiveness. In this way, it promotes a mesenchymal epithelial transition (MET) by the induction of cadherin expression and the re-localization of β -catenin from the nuclei to the membrane. Wnt5A expression is lost in anaplastic carcinoma, leading to a more aggressive tumor in which proliferation, migration, and invasiveness are enhanced.

Wnt IN FAMILIAL SYNDROMES

Sporadic mutation of the *APC* gene is less frequent in thyroid tumors, but there is a high frequency of PTC in several syndromes carrying *APC* mutations, such as familial adenomatous polyposis (FAP), Gardner's syndrome, and Turcot's syndrome (Soravia et al., 1999). FAP arises as a consequence of germinal mutations in one allele of the *APC* gene. Patients develop mainly colonic polyps and non-colonic malignancies, the most frequent being PTC. These PTCs have characteristic histological structures and are called the Cribriform–Mucinous Variant of PTC (CMV of PTC), because of their morula-like structure. Such structures are frequent in other tumors and correlate with nuclear β -catenin and activation of the Wnt/ β -catenin pathway. Contrary to colorectal neoplasms that exhibit a loss of heterozygosity in the *APC* gene, the CMV of PTC maintains heterozygosity and seems to need other gene alterations to originate a tumor. RET–PTC rearrangements have been described as a frequent event in CMV PTC–FAP tumors, further suggesting that *APC* mutation alone is not sufficient as a tumor initiator (Cetta et al., 1998, 2000).

Mutations in the phosphorylation sites of β -catenin are also found in the CMV of PTC, where nuclear localization of β -catenin correlates with poorly or undifferentiated tumors. In one study it was suggested that a mutation in exon 3 of the β -catenin gene, *CTNNB1*, could be an early molecular event in the CMV of PTC, although mutations in other genes frequently altered in PTC, such as *RET*, *RAS*, or *BRAF* were not studied (Xu et al., 2003).

CANCER STEM CELLS AND THE Wnt PATHWAY

Wnt proteins contribute to the homeostasis of several tissues of epithelial origin, like intestine and skin. This is because activation of the Wnt pathway is absolutely required for driving the stem cell/progenitor compartment. This pathway is altered in thyroid

malignancies, together with other stem cell-regulating pathways such as Hedgehog and Notch signaling, which supports the CSC model (reviewed in Derwahl, 2011).

In fact, it is well accepted that the Wnt/ β -catenin pathway is also necessary for the maintenance of CSCs. Thus, in colon the inappropriate activation of this pathway by APC or β -catenin gene mutations promotes the growth of tumor cells exhibiting a stem cell-like expression profile (Vermeulen et al., 2010). In breast cancer, the Wnt pathway is upregulated in CSCs by Wnt ligands secreted by the tumor microenvironment (Malanchi et al., 2011). Concerning thyroid CSCs there are still few data, but increasing evidence supports the existence of CSCs and the role of the Wnt pathway in this gland. Recent data demonstrate that CSCs from different types of thyroid carcinomas (PTC, FTC, and ATC), have different properties: CSCs isolated from ATC are the most aggressive and tumorigenic, followed by CSCs from PTC and FTC (Todaro et al., 2010). These data demonstrate that the malignancy of the CSCs correlates with the characteristics of the tumor and could reconcile the multistep process of thyroid carcinogenesis with the CSC hypothesis (Derwahl, 2011). Interestingly, the data reported by Todaro et al. showed constitutive activation of cMet, Akt, and β -catenin, together with downregulation of E-cadherin, in CSCs derived from the most undifferentiated thyroid tumors. This correlated with a higher migration capacity and metastatic rate. Although the above results are very promising, further studies are needed to evaluate the activation of the Wnt pathway and its role in CSC stemness or maintenance.

THE Wnt PATHWAY AS A TARGET FOR THYROID CANCER TREATMENT

Thyroid cancer has, in general terms, a very good outcome as radioiodine treatment is a very effective therapy. However, there are still some critical challenges that the classical clinicopathological approach has not been able to solve, and in some poorly differentiated radioiodine-resistant tumors and in ATC treatment options are limited.

In the past years, new drugs such as tyrosine kinase inhibitors or MAPK inhibitors proved to be quite efficient. The findings regarding the involvement of the Wnt pathway in thyroid cancer, its crosstalk with tyrosine kinase receptors such as RET and the involvement of β -catenin and Axin in ATC suggest that this pathway may be a potential therapeutic target. Current therapies with tyrosine kinase inhibitors such as Imatinid or Vandetanib seem to work in part by inhibiting the Wnt/ β -catenin pathway. Treatment with Imatinid of anaplastic human cells, positive for the tyrosine kinase c-abl, induced a decrease in cell proliferation and invasiveness by reducing nuclear β -catenin and increasing β -catenin/E-cadherin binding to the plasma membrane. Imatinid attenuated TCF activity, which in turn reduced expression of its target gene *cyclin D1* leading to cell growth arrest (Rao et al., 2006). Treatment with Vandetanib of papillary TPC1 cells carrying a RET/PTC rearrangement also stabilized β -catenin in the plasma membrane, decreasing the expression of β -catenin target genes such as *c-myc* and *cyclin D1*, and decreasing cell growth and migration (Tartari et al., 2011). These results underscore the importance of Wnt pathway activation in thyroid cancer progression.

Interestingly, non-steroidal anti-inflammatory drugs such as Sundilac, which target the Wnt/ β -catenin pathway, have been used in colon cancer treatment (Rice et al., 2003). Sundilac also reduces β -catenin expression, which is accompanied by a decrease in cell growth in human PTC cell lines overexpressing BRAF^{V600E} but not RET/PTC3 (Cho et al., 2010).

Finally, a conditionally replicative adenovirus harbouring the E1A and E1B expression under the control of TCF response elements has been reported. These constructs replicate specifically in cells with an active Wnt/ β -catenin pathway. This therapeutic approach has been used in xenograft tumors in nude mice developed from several thyroid cancer cell lines with good results regarding tumor size reduction, and should be further developed in the future (Abbosh et al., 2007).

CONCLUDING REMARKS AND FUTURE PERSPECTIVES

It has become evident that the Wnt pathways are involved in thyroid cancer progression.

Wnt/ β -catenin-independent pathways appear to act as tumor suppressors, because downregulation of Wnt5A, an activator of the non-canonical pathways, is needed to enhance the migratory and invasive capacity of thyroid tumor cells. The Wnt/ β -catenin-dependent pathway, on the other hand, seems to be involved in the proliferation of normal thyroid cells, which is a highly controlled process.

In the earliest stages of progression of tumors such as FA or well-differentiated FTC and PTC, β -catenin remains mainly attached to the cell membrane, but begins to appear in the cytoplasm. In these early stages, tumors carrying RET/PTC rearrangements proliferate in a β -catenin-dependent way. Although in cell culture this enhanced proliferation correlates with nuclear accumulation of β -catenin and high expression of the *cyclin D1* and *c-Myc* genes, in tumor samples no such correlations were found and β -catenin was visible only in the cytoplasm. Further studies are needed to understand the correlation between cytoplasmic β -catenin, the expression of its cell cycle target genes, and the role of β -catenin in these tumors.

In poorly and undifferentiated carcinomas, β -catenin is found in the nuclei, and mutations in this gene or in other genes of the pathway such as *Axin1* induce the constitutive activation of the canonical Wnt pathway, which triggers an increase in proliferation.

In conclusion, β -catenin has a direct role in the proliferation of poorly and undifferentiated thyroid tumor cells, but more studies are needed to establish the role of β -catenin in earlier stages of thyroid tumor progression.

The use of animal models like APCMin or $\Delta N\beta$ -catenin mice, which have a constitutively activated Wnt/ β -catenin pathway, could be of great interest for better understanding the mechanism by which the Wnt pathway promotes tumor growth in thyroid cancer.

The Wnt/ β -catenin pathway is involved in the transformation of a large number of tumors, and for this reason in the past few years several groups have been looking for specific inhibitors of this pathway. These inhibitors act through several mechanisms: increasing the stability of the destruction complex (Huang et al., 2009) in order to decrease cytoplasmic and nuclear β -catenin levels, or disrupting the interaction between β -catenin and the

transcription factors TCF/LEF (Lepourcelet et al., 2004) abolishing the transcription of cell cycle genes. The development of these inhibitors could contribute to the treatment of thyroid carcinomas, especially some anaplastic carcinomas, which show a clear activation of the Wnt/ β -catenin pathway and have a poor prognosis due to their aggressiveness and the loss of differentiation markers.

REFERENCES

- Abbosh, P. H., Li, X., Li, L., Gardner, T. A., Kao, C., and Nephew, K. P. (2007). A conditionally replicative, Wnt/ β -catenin pathway-based adenovirus therapy for anaplastic thyroid cancer. *Cancer Gene Ther.* 14, 399–408.
- Aguilera, O., Fraga, M. F., Ballestar, E., Paz, M. F., Herranz, M., Espada, J., Garcia, J. M., Munoz, A., Esteller, M., and Gonzalez-Sancho, J. M. (2006). Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist DICKKOPF-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer. *Oncogene* 25, 4116–4121.
- Arufe, M. C., Lu, M., Kubo, A., Keller, G., Davies, T. F., and Lin, R. Y. (2006). Directed differentiation of mouse embryonic stem cells into thyroid follicular cells. *Endocrinology* 147, 3007–3015.
- Berx, G., and van Roy, F. (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a003129.
- Brabant, G., Hoang-Vu, C., Cetin, Y., Dralle, H., Scheumann, G., Molne, J., Hansson, G., Jansson, S., Ericson, L. E., and Nilsson, M. (1993). E-cadherin: a differentiation marker in thyroid malignancies. *Cancer Res.* 53, 4987–4993.
- Cali, G., Gentile, F., Mogavero, S., Pallante, P., Nitsch, R., Ciancia, G., Ferraro, A., Fusco, A., and Nitsch, L. (2012). CDH16/Ksp-cadherin is expressed in the developing thyroid gland and is strongly down-regulated in thyroid carcinomas. *Endocrinology* 153, 522–534.
- Cassinelli, G., Favini, E., Degl'Innocenti, D., Salvi, A., De Petro, G., Pierotti, M. A., Zunino, F., Borrello, M. G., and Lanzi, C. (2009). RET/PTC1-driven neoplastic transformation and proinvasive phenotype of human thyrocytes involve Met induction and beta-catenin nuclear translocation. *Neoplasia* 11, 10–21.
- Castellone, M. D., De Falco, V., Rao, D. M., Bellelli, R., Muthu, M., Basolo, F., Fusco, A., Gutkind, J. S., and Santoro, M. (2009). The beta-catenin axis integrates multiple signals downstream from RET/papillary thyroid carcinoma leading to cell proliferation. *Cancer Res.* 69, 1867–1876.
- Cerrato, A., Fulciniti, F., Avallone, A., Benincasa, G., Palombini, L., and Grieco, M. (1998). Beta- and gamma-catenin expression in thyroid carcinomas. *J. Pathol.* 185, 267–272.
- Cetta, F., Chiappetta, G., Melillo, R. M., Petraci, M., Montalto, G., Santoro, M., and Fusco, A. (1998). The ret/ptc1 oncogene is activated in familial adenomatous polyposis-associated thyroid papillary carcinomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 1003–1006.
- Cetta, F., Montalto, G., Gori, M., Curia, M. C., Cama, A., and Olschwang, S. (2000). Germline mutations of the APC gene in patients with familial adenomatous polyposis-associated thyroid carcinoma: results from a European cooperative study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 286–292.
- Chen, G., Jiang, Q., You, Z., Yao, J., Mou, L., Lin, X., Shen, X., You, T., Lin, Q., Wen, J., and Lin, L. (2010). Regulation of GSK-3 β in the proliferation and apoptosis of human thyrocytes investigated using a GSK-3 β -targeting RNAi adenovirus expression vector: involvement the Wnt/ β -catenin pathway. *Mol. Biol. Rep.* 37, 2773–2779.
- Cho, N. L., Lin, C. I., Whang, E. E., Carothers, A. M., Moore, F. D. Jr., and Ruan, D. T. (2010). Sulindac reverses aberrant expression and localization of beta-catenin in papillary thyroid cancer cells with the BRAFV600E mutation. *Thyroid* 20, 615–622.
- de Cristofaro, T., Di Palma, T., Fichera, I., Lucci, V., Parrillo, L., De Felice, M., and Zannini, M. (2012). An essential role for pax8 in the transcriptional regulation of cadherin-16 in thyroid cells. *Mol. Endocrinol.* 26, 67–78.
- De Felice, M., and Di Lauro, R. (2004). Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms. *Endocr. Rev.* 25, 722–746.
- Derwahl, M. (2011). Linking stem cells to thyroid cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, 610–613.
- Dick, J. E. (2008). Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 112, 4793–4807.
- Dick, J. E. (2009). Looking ahead in cancer stem cell research. *Nat. Biotechnol.* 27, 44–46.
- Dumaz, N., and Marais, R. (2005). Integrating signals between cAMP and the RAS/RAF/MEK/ERK signalling pathways. Based on the anniversary prize of the Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie lecture delivered on 5 July 2003 at the Special FEBS Meeting in Brussels. *FEBS J.* 272, 3491–504.
- Fagin, J. A., Matsuo, K., Karmakar, A., Chen, D. L., Tang, S. H., and Koefler, H. P. (1993). High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *J. Clin. Invest.* 91, 179–184.
- Filipovich, A., Gehrke, I., Poll-Wolbeck, S. J., and Kreuzer, K. A. (2011). Physiological inhibitors of Wnt signaling. *Eur. J. Haematol.* 86, 453–465.
- Garcia-Rostan, G., Camp, R. L., Herrero, A., Carcangiu, M. L., Rimm, D. L., and Tallini, G. (2001). Beta-catenin dysregulation in thyroid neoplasms: down-regulation, aberrant nuclear expression, and CTNNB1 exon 3 mutations are markers for aggressive tumor phenotypes and poor prognosis. *Am. J. Pathol.* 158, 987–996.
- Garcia-Rostan, G., Costa, A. M., Pereira-Castro, I., Salvatore, G., Hernandez, R., Hermsem, M. J., Herrero, A., Fusco, A., Cameselle-Teijeiro, J., and Santoro, M. (2005). Mutation of the PIK3CA gene in anaplastic thyroid cancer. *Cancer Res.* 65, 10199–10207.
- Garcia-Rostan, G., Tallini, G., Herrero, A., D'Aquila, T. G., Carcangiu, M. L., and Rimm, D. L. (1999). Frequent mutation and nuclear localization of beta-catenin in anaplastic thyroid carcinoma. *Cancer Res.* 59, 1811–1815.
- Graff, J. R., Greenberg, V. E., Herman, J. G., Westra, W. H., Boghaert, E. R., Ain, K. B., Saji, M., Zeiger, M. A., Zimmer, S. G., and Baylin, S. B. (1998). Distinct patterns of E-cadherin CpG island methylation in papillary, follicular, Hurthle's cell, and poorly differentiated human thyroid carcinoma. *Cancer Res.* 58, 2063–2066.
- Guigon, C. J., Zhao, L., Lu, C., Willingham, M. C., and Cheng, S. Y. (2008). Regulation of beta-catenin by a novel nongenomic action of thyroid hormone beta receptor. *Mol. Cell. Biol.* 28, 4598–4608.
- He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281, 1509–1512.
- Helmbrecht, K., Kispert, A., von Wasielewski, R., and Brabant, G. (2001). Identification of a Wnt/ β -catenin signaling pathway in human thyroid cells. *Endocrinology* 142, 5261–5266.
- Huang, S. M., Mishina, Y. M., Liu, S., Cheung, A., Stegmeier, F., Michaud, G. A., Charlat, O., Wietzel, E., Zhang, Y., Wiessner, S., Hild, M., Shi, X., Wilson, C. J., Mikanin, C., Myer, V., Fazal, A., Tomlinson, R., Serluca, F., Shao, W., Cheng, H., Shultz, M., Rau, C., Schirle, M., Schlegl, J., Ghidelli, S., Fawell, S., Lu, C., Curtis, D., Kirschner, M. W., Lengauer, C., Finan, P. M., Tallarico, J. A., Bouwmeester, T., Porter, J. A., Bauer, A., and Cong, F. (2009). Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature* 461, 614–620.
- Hulsken, J., Birchmeier, W., and Behrens, J. (1994). E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 127(Pt 2), 2061–2069.
- Ishigaki, K., Namba, H., Nakashima, M., Nakayama, T., Mitsutake, N., Hayashi, T., Maeda, S., Ichinose, M., Kanematsu, T., and Yamashita, S. (2002). Aberrant localization of beta-catenin correlates with overexpression of its target gene in human papillary thyroid cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 3433–3440.
- Kikuchi, A., and Yamamoto, H. (2008). Tumor formation due to abnormalities in the beta-catenin-independent pathway of Wnt signaling. *Cancer Sci.* 99, 202–208.
- Kim, W. B., Lewis, C. J., McCall, K. D., Malgor, R., Kohn, A. D., Moon, R. T., and Kohn, L. D. (2007). Overexpression of Wnt-1 in thyrocytes enhances cellular growth but suppresses transcription of the thyroperoxidase gene via different signaling mechanisms. *J. Endocrinol.* 193, 93–106.

- Kimura, T., Van Keymeulen, A., Golstein, J., Fusco, A., Dumont, J. E., and Roger, P. P. (2001). Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of in vitro models. *Endocr. Rev.* 22, 631–656.
- Kremenevskaja, N., von Wasielewski, R., Rao, A. S., Schofl, C., Andersson, T., and Brabant, G. (2005). Wnt-5a has tumor suppressor activity in thyroid carcinoma. *Oncogene* 24, 2144–2154.
- Kroll, T. G., Sarraf, P., Pecciarini, L., Chen, C. J., Mueller, E., Spiegelman, B. M., and Fletcher, J. A. (2000). PAX8-PPARGgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]. *Science* 289, 1357–1360.
- Kurihara, T., Ikeda, S., Ishizaki, Y., Fujimori, M., Tokumoto, N., Hirata, Y., Ozaki, S., Okajima, M., Sugino, K., and Asahara, T. (2004). Immunohistochemical and sequencing analyses of the Wnt signaling components in Japanese anaplastic thyroid cancers. *Thyroid* 14, 1020–1029.
- Lepourcelet, M., Chen, Y. N., France, D. S., Wang, H., Crews, P., Petersen, F., Bruseo, C., Wood, A. W., and Shivdasani, R. A. (2004). Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/beta-catenin protein complex. *Cancer Cell* 5, 91–102.
- Lin, R. Y. (2011). Thyroid cancer stem cells. *Nat. Rev. Endocrinol.* 7, 609–616.
- Lu, C., Zhu, X., Willingham, M. C., and Cheng, S. Y. (2011). Activation of tumor cell proliferation by thyroid hormone in a mouse model of follicular thyroid carcinoma. *Oncogene*. doi: 10.1038/onc.2011.390. [Epub ahead of print].
- MacDonald, B. T., Tamai, K., and He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* 17, 9–26.
- Malanchi, I., Santamaria-Martinez, A., Susanto, E., Peng, H., Lehr, H. A., Delaloye, J. F., and Huelsken, J. (2011). Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature* 481, 85–89.
- McDonald, S. L., and Silver, A. (2009). The opposing roles of Wnt-5a in cancer. *Br. J. Cancer* 101, 209–214.
- Medina, D. L., and Santisteban, P. (2000). Thyrotropin-dependent proliferation of in vitro rat thyroid cell systems. *Eur. J. Endocrinol.* 143, 161–178.
- Meirmanov, S., Nakashima, M., Kondo, H., Matsufuji, R., Takamura, N., Ishigaki, K., Ito, M., Prouglo, Y., Yamashita, S., and Sekine, I. (2003). Correlation of cytoplasmic beta-catenin and cyclin D1 overexpression during thyroid carcinogenesis around Semipalatinsk nuclear test site. *Thyroid* 13, 537–545.
- Nikiforov, Y. E., and Nikiforova, M. N. (2011). Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat. Rev. Endocrinol.* 7, 569–580.
- Nishita, M., Enomoto, M., Yamagata, K., and Minami, Y. (2010). Cell/tissue-tropic functions of Wnt5a signaling in normal and cancer cells. *Trends Cell Biol.* 20, 346–354.
- O'Sullivan, C., Barton, C. M., Staddon, S. L., Brown, C. L., and Lemoine, N. R. (1991). Activating point mutations of the gsp oncogene in human thyroid adenomas. *Mol. Carcinog.* 4, 345–349.
- Parma, J., Duprez, L., Van Sande, J., Cochaux, P., Gervy, C., Mockel, J., Dumont, J., and Vassart, G. (1993). Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas. *Nature* 365, 649–651.
- Polakis, P. (2007). The many ways of Wnt in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 17, 45–51.
- Rao, A. S., Kremenevskaja, N., von Wasielewski, R., Jakubcakova, V., Kant, S., Resch, J., and Brabant, G. (2006). Wnt/beta-catenin signaling mediates antineoplastic effects of imatinib mesylate (gleevec) in anaplastic thyroid cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 159–168.
- Reya, T., and Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434, 843–850.
- Rezk, S., Brynes, R. K., Nelson, V., Thein, M., Patwardhan, N., Fischer, A., and Khan, A. (2004). Beta-catenin expression in thyroid follicular lesions: potential role in nuclear envelope changes in papillary carcinomas. *Endocr. Pathol.* 15, 329–337.
- Rice, P. L., Kelloff, J., Sullivan, H., Driggers, L. J., Beard, K. S., Kuwada, S., Piazza, G., and Ahnen, D. J. (2003). Sulindac metabolites induce caspase- and proteasome-dependent degradation of beta-catenin protein in human colon cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 2, 885–892.
- Riesco-Eizaguirre, G., Rodriguez, I., De la Vieja, A., Costamagna, E., Carasco, N., Nistal, M., and Santisteban, P. (2009). The BRAFV600E oncogene induces transforming growth factor beta secretion leading to sodium iodide symporter repression and increased malignancy in thyroid cancer. *Cancer Res.* 69, 8317–8325.
- Riesco-Eizaguirre, G., and Santisteban, P. (2007). Molecular biology of thyroid cancer initiation. *Clin. Transl. Oncol.* 9, 686–693.
- Rubinfeld, B., Albert, I., Porfiri, E., Fiol, C., Munemitsu, S., and Polakis, P. (1996). Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* 272, 1023–1026.
- Santisteban, P., and Bernal, J. (2005). Thyroid development and effect on the nervous system. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 6, 217–228.
- Soravia, C., Sugg, S. L., Berk, T., Mitri, A., Cheng, H., Gallinger, S., Cohen, Z., Asa, S. L., and Bapat, B. V. (1999). Familial adenomatous polyposis-associated thyroid cancer: a clinical, pathological, and molecular genetics study. *Am. J. Pathol.* 154, 127–135.
- Strumane, K., Berx, G., and Van Roy, F. (2004). Cadherins in cancer. *Handb. Exp. Pharmacol.* 69–103.
- Tartari, C. J., Donadoni, C., Manieri, E., Mologni, L., Mina, P. D., Villa, A., and Gambacorti-Passerini, C. (2011). Dissection of the RET/beta-catenin interaction in the TPC1 thyroid cancer cell line. *Am. J. Cancer Res.* 1, 716–725.
- Tetsu, O., and McCormick, F. (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422–426.
- Thomas, D., Friedman, S., and Lin, R. Y. (2008). Thyroid stem cells: lessons from normal development and thyroid cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 15, 51–58.
- Todaro, M., Iovino, F., Eterno, V., Cammareri, P., Gambarà, G., Espina, V., Gulotta, G., Dieli, F., Giordano, S., De Maria, R., and Stassi, G. (2010). Tumorigenic and metastatic activity of human thyroid cancer stem cells. *Cancer Res.* 70, 8874–8885.
- Tzelepi, V. N., Tsamandas, A. C., Vlotinou, H. D., Vagianos, C. E., and Scopa, C. D. (2008). Tight junctions in thyroid carcinogenesis: diverse expression of claudin-1, claudin-4, claudin-7 and occludin in thyroid neoplasms. *Mod. Pathol.* 21, 22–30.
- Vassart, G., and Dumont, J. E. (1992). The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocr. Rev.* 13, 596–611.
- Vermeulen, L., De Sousa, E. M. F., van der Heijden, M., Cameron, K., de Jong, J. H., Borovski, T., Tuynman, J. B., Todaro, M., Merz, C., Rodermond, H., Sprick, M. R., Kemper, K., Richel, D. J., Stassi, G., and Medema, J. P. (2010). Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat. Cell Biol.* 12, 468–476.
- Wada, H., and Okamoto, H. (2009). Roles of planar cell polarity pathway genes for neural migration and differentiation. *Dev. Growth Differ.* 51, 233–240.
- Xu, B., Yoshimoto, K., Miyauchi, A., Kuma, S., Mizusawa, N., Hirokawa, M., and Sano, T. (2003). Cribriform-morular variant of papillary thyroid carcinoma: a pathological and molecular genetic study with evidence of frequent somatic mutations in exon 3 of the beta-catenin gene. *J. Pathol.* 199, 58–67.
- Zaballos, M. A., Garcia, B., and Santisteban, P. (2008). Gbetagamma dimers released in response to thyrotropin activate phosphoinositide 3-kinase and regulate gene expression in thyroid cells. *Mol. Endocrinol.* 22, 1183–1199.
- Zhang, J., Gill, A. J., Issacs, J. D., Atmore, B., Johns, A., Delbridge, L. W., Lai, R., and McMullen, T. P. (2011). The Wnt/beta-catenin pathway drives increased cyclin D1 levels in lymph node metastasis in papillary thyroid cancer. *Hum. Pathol.* PMID: 22204713. [Epub ahead of print].

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 01 December 2011; accepted: 09 February 2012; published online: 29 February 2012.

Citation: Sastre-Perona A and Santisteban P (2012) Role of the Wnt pathway in thyroid cancer. *Front. Endocrin.* 3:31. doi: 10.3389/fendo.2012.00031

This article was submitted to *Frontiers in Cancer Endocrinology*, a specialty of *Frontiers in Endocrinology*.

Copyright © 2012 Sastre-Perona and Santisteban. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License, which permits non-commercial use, distribution, and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Genome-wide analysis of Pax8 binding provides new insights into thyroid functions

Sergio Ruiz-Llorente^{1,2}, Enrique Carrillo SantadePau^{1,3,4}, Ana Sastre-Perona¹, Cristina Montero-Conde^{1,2}, Gonzalo Gómez-López³, James A Fagin², Alfonso Valencia³, David G Pisano³ and Pilar Santisteban^{1*}

Abstract

Background: The transcription factor Pax8 is essential for the differentiation of thyroid cells. However, there are few data on genes transcriptionally regulated by Pax8 other than thyroid-related genes. To better understand the role of Pax8 in the biology of thyroid cells, we obtained transcriptional profiles of Pax8-silenced PCC13 thyroid cells using whole genome expression arrays and integrated these signals with global cis-regulatory sequencing studies performed by ChIP-Seq analysis

Results: Exhaustive analysis of Pax8 immunoprecipitated peaks demonstrated preferential binding to intragenic regions and CpG-enriched islands, which suggests a role of Pax8 in transcriptional regulation of orphan CpG regions. In addition, ChIP-Seq allowed us to identify Pax8 partners, including proteins involved in tertiary DNA structure (CTCF) and chromatin remodeling (Sp1), and these direct transcriptional interactions were confirmed *in vivo*. Moreover, both factors modulate Pax8-dependent transcriptional activation of the sodium iodide symporter (*Nis*) gene promoter. We ultimately combined putative and novel Pax8 binding sites with actual target gene expression regulation to define Pax8-dependent genes. Functional classification suggests that Pax8-regulated genes may be directly involved in important processes of thyroid cell function such as cell proliferation and differentiation, apoptosis, cell polarity, motion and adhesion, and a plethora of DNA/protein-related processes.

Conclusion: Our study provides novel insights into the role of Pax8 in thyroid biology, exerted through transcriptional regulation of important genes involved in critical thyrocyte processes. In addition, we found new transcriptional partners of Pax8, which functionally cooperate with Pax8 in the regulation of thyroid gene transcription. Besides, our data demonstrate preferential location of Pax8 in non-promoter CpG regions. These data point to an orphan CpG island-mediated mechanism that represents a novel role of Pax8 in the transcriptional output of the thyrocyte.

Keywords: Pax8, ChIP-Seq, Expression arrays, CpG island, CTCF, SP1

Background

Gene regulation has been the subject of intense investigation over the past decades, mainly focusing on detailed characterization of a particular gene or gene family. However, genome-wide mapping of protein-DNA interactions and epigenetic marks is essential for a full understanding of transcriptional regulation. A precise map of binding sites for transcription factors (TFs), core transcriptional machinery, and other DNA-binding proteins

is necessary to decode the gene regulatory networks and their contribution to developmental processes and human disease [1]. In fact, regulation of gene expression by TFs is one of the major mechanisms for controlling cell proliferation, differentiation, and function.

To elucidate the mechanism(s) operating in the establishment and maintenance of cell-specific differentiation, we used thyroid epithelial cells as a model system. These cells are the largest cell population of the thyroid gland and express different TFs called Nkx2.1, Foxe1, Hhex and Pax8, which define the thyroid differentiated phenotype [2,3]. It is well known that these factors bind to the promoter regions of thyroid-specific genes, such as the genes encoding

* Correspondence: psantisteban@iib.uam.es

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y Universidad Autónoma de Madrid (UAM), C/Arturo Duperier 4, Madrid 28029, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

Thyroglobulin (*Tg*), Thyroperoxidase (*Tpo*), and the Sodium Iodide Symporter (*Nis*), thus regulating their expression. Nevertheless, despite the key relevance of these TFs for thyroid biology, few studies have described additional *loci* that are transcriptionally regulated by the above mentioned TFs, nor have sequences been described to which these factors bind in enhancers, silencers, or boundary elements that could potentially regulate the transcription of genes over large distances.

Among these thyroid TFs, Pax8 is a member of the paired box-containing proteins and is expressed in the thyroid and kidney, and in the central nervous system during development [4]. It plays an essential role in the differentiation of thyroid cells and, according to the phenotype of *Pax8* knockout mice, it seems to be responsible for the formation of the follicles of polarized epithelial thyroid cells [5]. Also, the association between mutations of *PAX8* and congenital hypothyroidism in humans underlines an important function of this transcription factor in thyroid pathologies [6]. In order to better understand its role in the maintenance of thyroid function, we explored the transcriptional profile of Pax8-silenced thyroid cells, and integrated these signals with global cis-regulatory sequencing studies (chromatin immunoprecipitation followed by sequencing; ChIP-Seq).

The ChIP-Seq strategy allowed us to identify a large number of novel *in vivo* Pax8 binding sites that were significantly associated with CpG islands or high GC content sequences. Interestingly, immunoprecipitated peaks were mainly located along intronic regions and grouped in distal positions with respect to transcriptional start sites. Consensus sequence screening of these areas suggested Pax8 interaction with several core transcriptional elements (motif ten element, Inr, and BRE), transcription factors belonging to the AP1 family, and trans-elements factors involved in high order chromatin structure (CTCF) and remodeling (Sp1). Co-immunoprecipitation and reporter assays demonstrated both physical binding and transcriptional cooperation between CTCF/Sp1 and Pax8. Combining sequencing and expression array data, we ultimately provided insights into Pax8-transcriptional networks in the differentiated thyroid that predict its involvement in relevant biological processes and pathways.

Results

Genomic features associated with Pax8 binding sites

In order to identify the genome-wide binding patterns of Pax8 in differentiated thyroid cells, we performed ChIP-Seq in PCCl3 rat thyrocytes using IP and non-IP conditions. Prior to massive sequencing, both conditions were interrogated to verify Pax8 binding site enrichment by means of semi-quantitative PCR (Additional file 1).

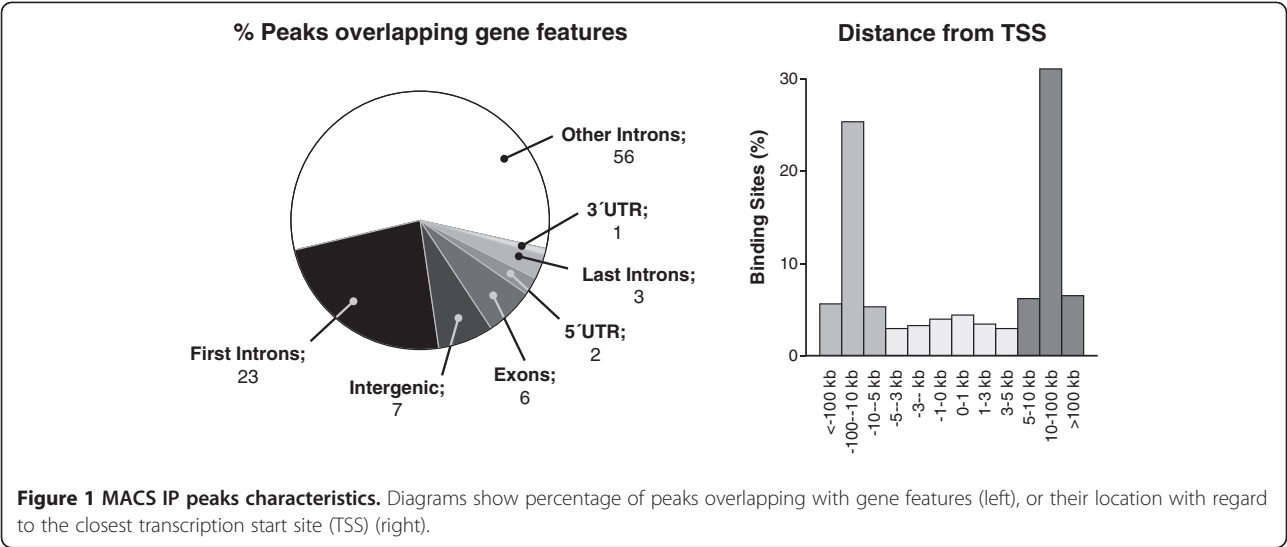
Using this approach, we confirmed DNA immunoprecipitation of Pax8 binding regions in the rat *Nis* and *Tpo* promoters (Additional file 1A), as previously described [7-9]. Therefore, we considered both IP and non-IP conditions as useful samples to further identify whole genome Pax8 binding sites by means of high throughput sequencing technology. After sequencing analysis, we obtained 11,613,355 and 12,125,758 raw reads for control and IP conditions, respectively. Of these, 6,714,002 (57.8%) and 6,431,519 (53.0%) fulfilled the ≤ 2 mismatches quality filter.

To further localize regions of Pax8 enrichment, we identified Pax8 peaks genome-wide. Peak detection analysis using MACS defined 13,151 Pax8-enriched regions with an average length of 681 bp (Additional file 2). Visual inspection of the Pax8 binding sites and the profiling data in a genome browser for well-known Pax8 targets like *Nis*, *Tpo*, [7,9] and *WT1* (Wilms' tumour gene 1) [10], showed Pax8 binding sites close to the 5'-UTRs of these genes as previously described. A detailed analysis of *Nis* (*Slc5a5*, Na^+/I^- symporter), whose transcription status is tightly regulated by Pax8 [7], showed a significant Pax8 binding site overlapping with the *Nis* upstream enhancer (Additional file 1B). These findings clearly validated ChIP-Seq as an efficient and powerful technique for mapping Pax8 binding sites in PCCl3 cells.

Association of Pax8 enriched regions with annotated genomic features indicated that Pax8 tends to localize within intronic regions (82%); only a few peaks revealed binding to coding (6%) or 5'-UTR regulatory regions (2%) (Figure 1). In addition, Pax8 binding sites showed preferential binding to regions located 10-100 kb upstream or downstream of the closest transcription start site (Figure 1). We also assessed the general sequence content of these peaks, including CG content and dinucleotide frequencies. We found a clearly increased correlation between Pax8 binding sites and CpG islands (Figure 2A) and CG simple repeat elements (Figure 2B) in comparison with other dinucleotide combinations throughout the rat genome (Figure 2C and 2D). All these data suggest preferential Pax8 interaction with "orphan" CGIs, CG-rich intragenic elements not associated to 5'-UTR regions [11].

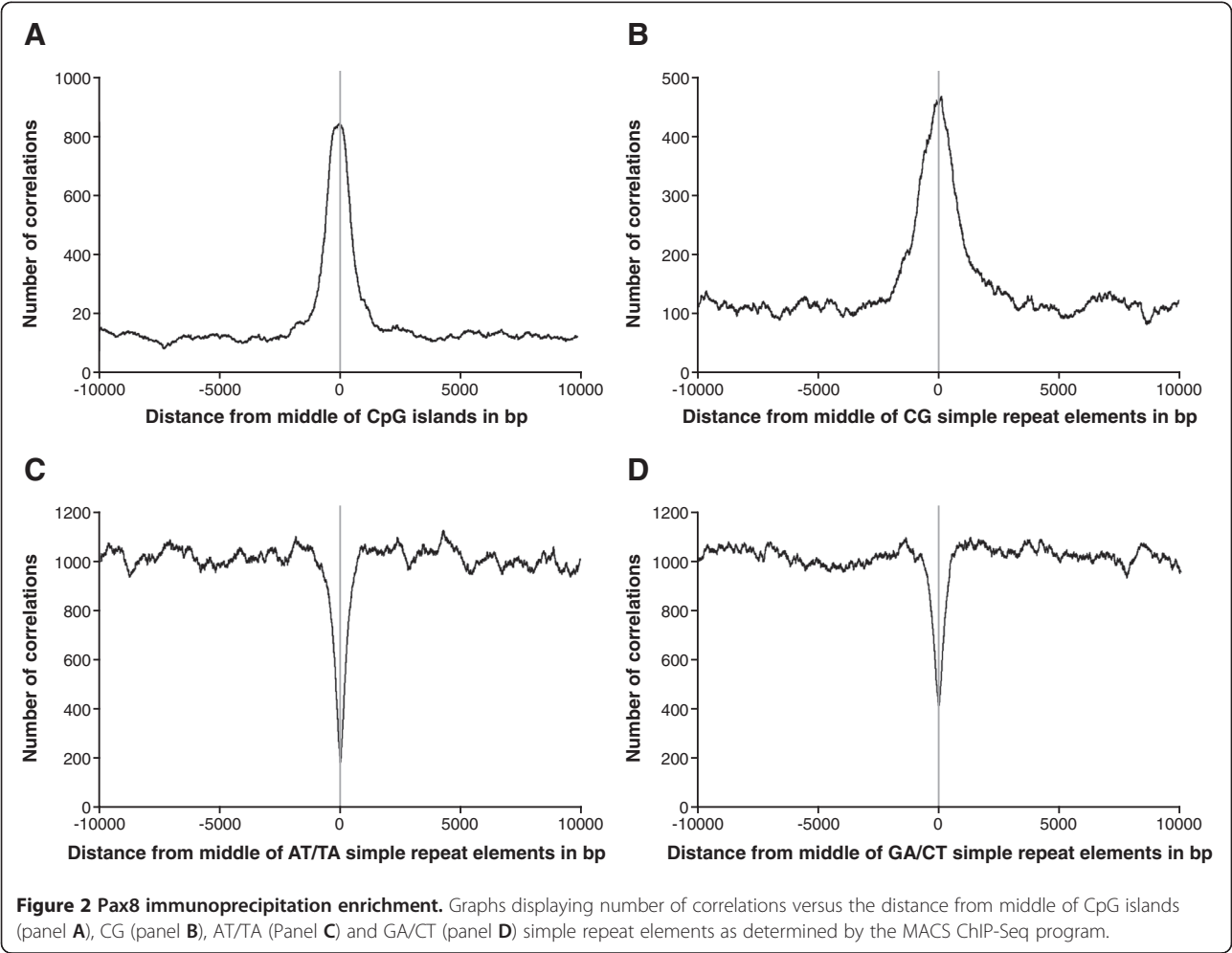
Pax8 immunoprecipitated regions delineate Pax8 consensus core sequence *in vivo*

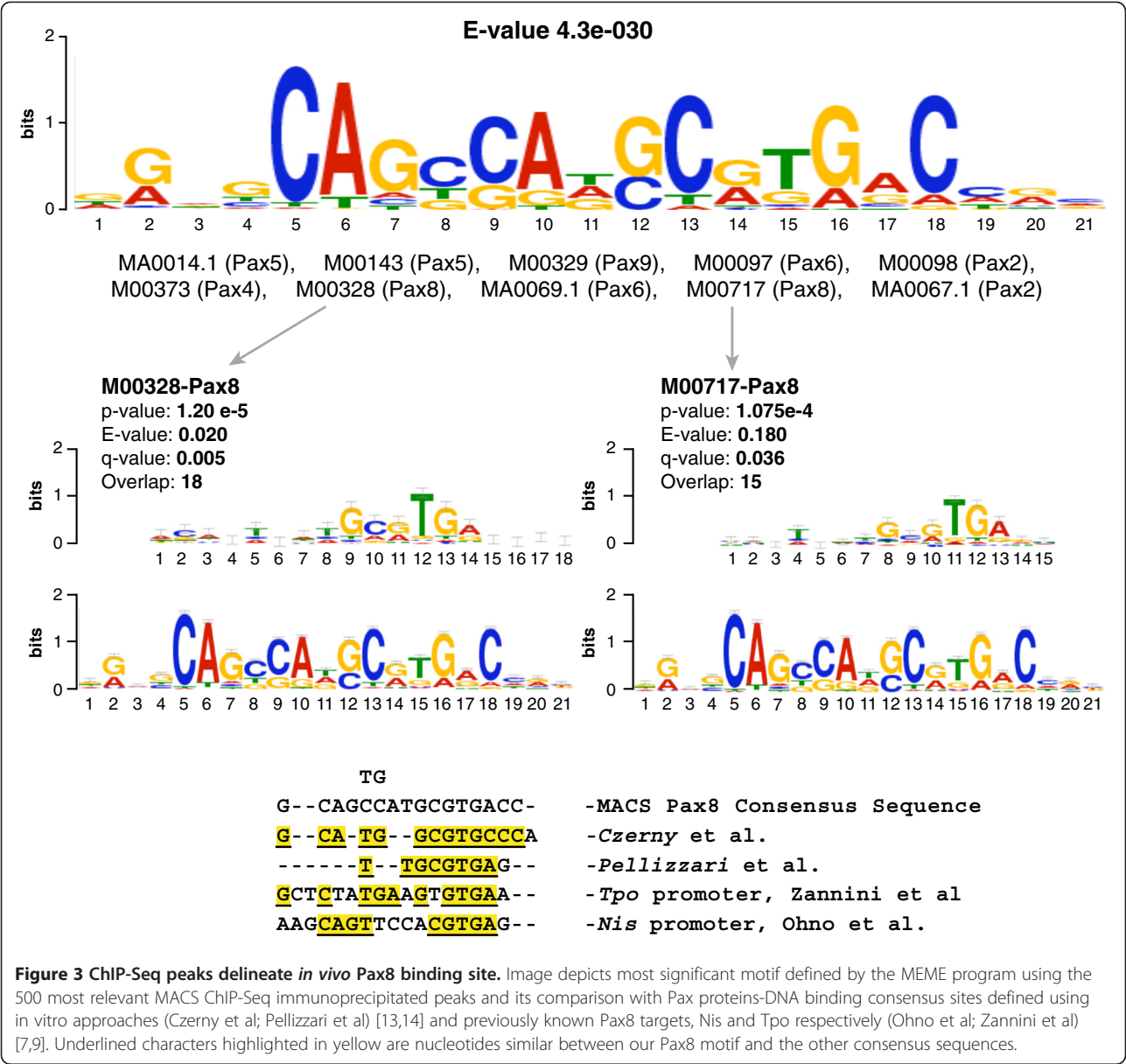
We considered the most significant Pax8 peaks (Additional file 3) to evaluate how efficiently ChIP immunoprecipitated the Pax8-DNA binding sequence. Among the most significant consensus motifs obtained using the MEME-chip and TOMTOM *in silico* tools, we observed a significant overrepresentation of Pax-related binding sites,



including sites for Pax8 and members of its own subfamily (Pax2 and Pax5) (Figure 3). The Pax8 binding motif here defined encompasses motifs obtained by individual-gene based approaches, such

as those defined for rat and human *TPO* [9,12] and for the rat *Nis* upstream enhancer [7] (Figure 3), as well as those defined by *in vitro* studies outlining the binding sequence for Pax8 [13] and the Pax2/5/8





subfamily (AAGCGTGAC) [14]. Of note, our study is the first to describe the *in vivo* Pax8 binding sequence derived from its DNA binding along the whole rat genome.

Immunoprecipitation data reveals interaction of Pax8 with various TFs

To identify possible interactions between Pax8 and other TFs, Genomatix suite screening was performed to identify the most over-represented motifs in the Pax8 binding regions identified by MACS [15]. Overrepresented consensus motifs in Pax8 peaks, as well as fold change and z-score values are shown in Table 1 and Additional file 4. These analyses showed an overrepresentation of the Pax5 (V\$Pax5.1 z-score = 87.59, overrepresentation: 2.86; V\$Pax5.2 z-score = 78.62, overrepresentation: 3.95) and Pax9 consensus motifs (V\$Pax9.1 z-score = 73.71; overrepresentation: 3.63) with a modest association for Pax8 (V\$Pax8.1 z-score = 5.46, overrepresentation: 1.07). These results may be explained by the DNA binding similarities among members of the same Pax subfamily (Pax2, Pax5, and Pax8).

In agreement with previous reports describing interactions between members of the Pax family and AP1 factors [16], we also observed enrichment of transcription factors belonging to this latter family (V\$NRF-1, nuclear respiratory factor-1; z-score = 146.13, overrepresentation = 5.02). Intriguingly, several transcription factor matrices (V\$CTCF, V\$ZF5 and V\$SP1F) and general transcriptional regulatory elements (O\$BRE, O\$INR-DPE, and *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens* Motif ten elements (O\$DMTE and O\$HMTE)) showed significant association with Pax8 IP

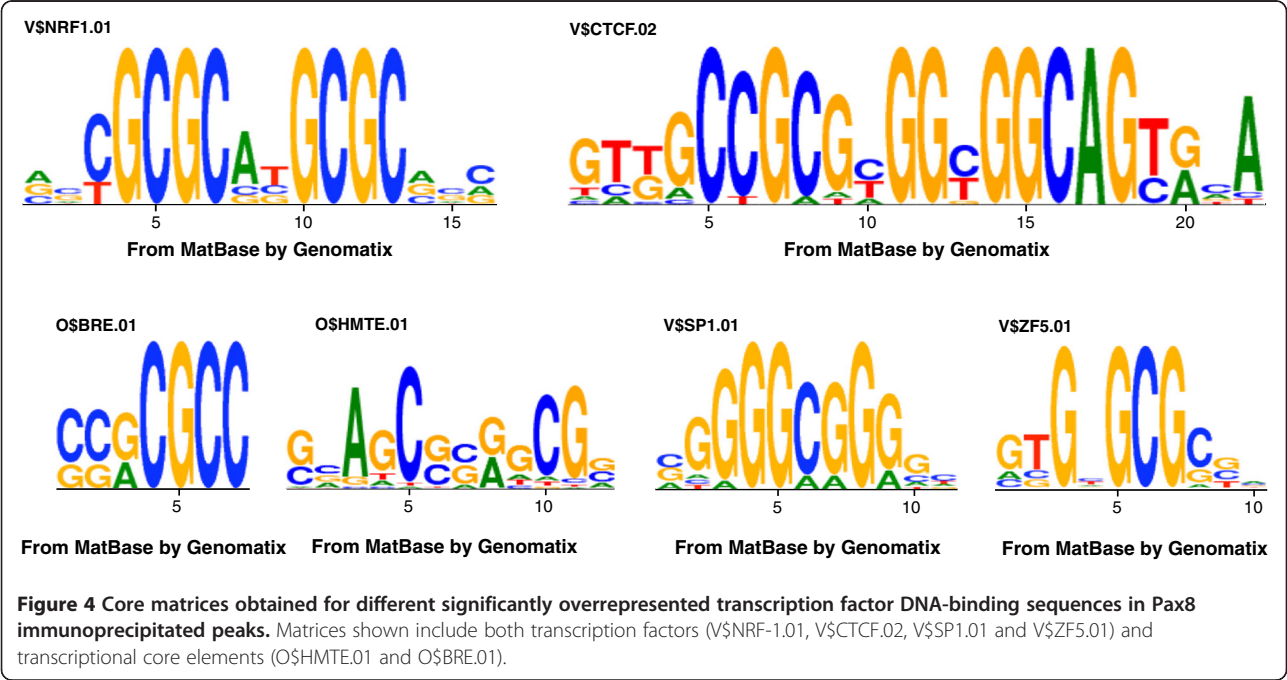
Table 1 Main DNA binding motifs overrepresented in Pax8-dependent peaks

TF Matrices	Family information	Matches in Input (n)	Expected (genome)	Overrep. (genome)	Z-Score (genome)
O\$BRE.01	Transcription factor II B (TFIIB) recognition element	924	88.75	10.41	88.61
O\$HMTE.01	Human motif ten element	2481	350.02	7.09	113.88
O\$XCPE.01	X gene core promoter element 1	5454	1531.85	3.56	100.21
O\$DMTE.01	Drosophila motif ten element	4415	1442.3	3.06	78.27
O\$INR_DPE.01	Initiator (INR) and downstream promoter element (DPE) with strictly maintained spacing	2460	1071.16	2.30	42.42
V\$NRF1.01	Nuclear respiratory factor 1	6640	1323.52	5.02	146.13
V\$SP1.02	GC-Box factors SP1/GC; Stimulating protein 1, ubiquitous zinc finger transcription factor	5792	1090.23	5.31	142.39
V\$SP1.03	GC-Box factors SP1/GC; Stimulating protein 1, ubiquitous zinc finger transcription factor	4802	1129.17	5.14	139.05
V\$ZF5.01	Zinc finger / POZ domain transcription factor	5543	1260.88	4.40	120.59
V\$CTCF.01	CCCTC-binding factor	4729	1015.47	4.66	116.52

The *Overrep. (genome)* column represents the fold overrepresentation of these matrices in our IP peaks compared to their presence in the rat genome, and the *Z-Score (genome)* column indicates association value between the DNA matrices and Pax8-immunoprecipitated DNA.

peaks (Table 1). In order to rule out any nonspecific effect of the Pax8 antibody on the recognition of these transcription factors not related to Pax8, we compared their amino acid sequences with the Pax8 protein by means of the DNASTar alignment program. No significant similarities were observed among the considered proteins, thus ruling out any unspecific binding of the Pax8 antibody (data not shown). As shown in their corresponding IP Genomatix motifs (Figure 4), all these transcription factors preferentially bind to regions with high GC content, which could be related to the association of Pax8 to CpG islands and CG repeats.

To validate the interactions between Pax8 and the TFs described before, we performed co-immuprecipitation assays in PCCL3 cells using specific antibodies for Pax8, Sp1 and CTCF. As shown in Figure 5A, both CTCF and Sp1 coprecipitate with Pax8, confirming physical binding among these transcription factors *in vivo* and suggesting the existence of common transcriptionally regulated targets. Given that the *Nis* promoter region conferring regulation by Pax8 (NIS upstream enhancer) overlapped with potential sites for both transcription regulators (data not shown), we performed transfection experiments in HeLa cells using a reporter construct



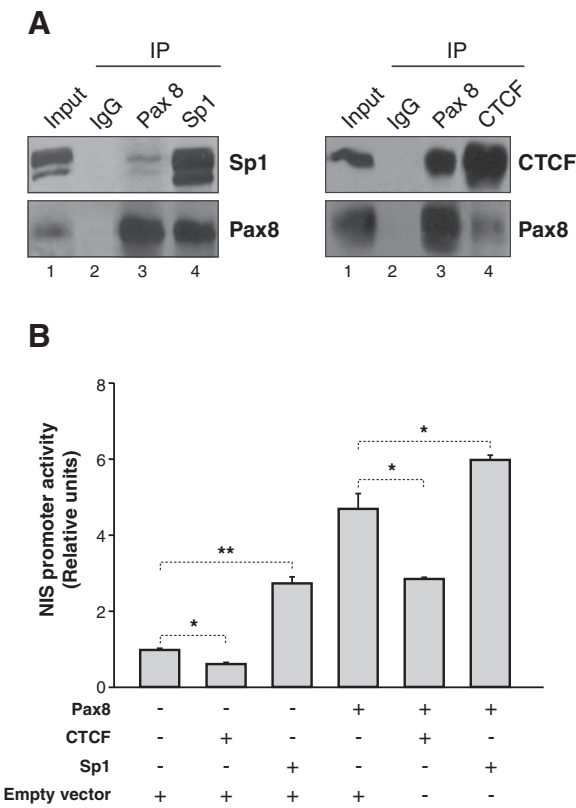


Figure 5 CoIP assays demonstrating physical interaction of Pax8 with Sp1 and CTCF. **A**) Nuclear extracts from control or hCTCF-transfected PCCl3 cells were obtained and immunoprecipitated (IP) with anti Pax8, anti-Sp1 or anti-CTCF antibodies. Immunoblotting was performed against Sp1 (top, left panel), CTCF (top, right panel) or Pax8 (bottom, left and right panels). Lanes 1 are the input and lanes 2 are the nonspecific IPs using IgG. The Figure shows a representative Western-Blot. **B**) Reporter assays were performed using the pNIS-2.8 promoter and expression vectors as indicated in the figure. Promoter activity is expressed as fold induction, relative to the activity observed in the presence of empty expression vector. The amount of total DNA used for each transfection was adjusted with the matched empty vector control to 1 µg. Luciferase activity was normalized to renilla activity derived from the cotransfected pRL-CMV vector to adjust for transfection efficiency. Results are mean ± SD of three independent experiments. * *p*-value < 0.005; **, *p*-value < 0.01.

containing the *Nis* promoter [17]. As shown in Figure 5B, Sp1 strikingly increased NIS transcriptional activity, while cotransfection of Pax8 and Sp1 resulted in a synergistic effect on promoter activation. On the other hand, cotransfection with CTCF induced a statistically significant decrease in transcription (Figure 5B). These data unequivocally demonstrate a functional cooperation between Pax8 and Sp1 and CTCF in transcriptional regulation.

Expression arrays analysis identifies a wide set of loci regulated by Pax8

We used whole genome expression arrays to identify Pax8-regulated genes by comparing expression profiles of Pax8-silenced PCCl3 cells with both scrambled siRNA-treated and wild type (wt) PCCl3 cells. This last condition was included to consistently integrate both expression array signals and global cis-regulatory sequencing studies into the same experimental conditions.

Misinterpretation of expression data due to compensatory effects via Pax8-related paralogues (Pax2 and Pax5) is ruled out, given that both transcription factors are not expressed in thyroid cells.

Regarding the comparison of siPax8-PCCl3 vs. wt PCCl3, 3,035 and 3,354 probes were down and up-regulated in the Pax8-silenced condition, respectively (Additional file 5). A lower number of significant probes was detected for siPax8-PCCl3 vs. siScramble-PCCl3 (797 and 777 probes were down and up-regulated in the Pax8-silenced condition, respectively) (Additional file 5). Statistically significantly differently expressed probes (adjusted *p*-values < 0.005) for both comparisons included 633 down and 565 up-regulated targets (Additional file 5), which represent a set of 849 loci.

Pax8 is involved in controlling key cellular events

Gene lists were ranked based on t-statistics for gene set enrichment analysis. The most significant GO terms and

adjusted *p*-values for both array comparisons are shown in Table 2, and more detailed data, including genes belonging to each significant category, are listed in Additional files 6, 7 and 8. In general, the FatiScan tool revealed significant association for biological processes related to immune response, molecule transport, response to stimuli, cell motion/adhesion, cell proliferation, and translational processes. In relation to this last term, ribosome-related GO classes were also observed for other FatiScan categories: molecular processes (structural constituent of ribosome; adjusted *p*-value: 4.43e-13), KEGG pathway (rno-03010; adjusted *p*-value: 8.7e-6), and cell component analysis (downregulation of ribosomes and ribonucleoprotein-related genes; GO: 0005840 and 0030529; adjusted *p*-value: 1.9e-5) (data not shown).

Single functional analysis

We additionally used the FatiGO *in silico* tool to extract Gene Ontology (GO) terms overrepresented in our down- and up-regulated set of differentially expressed genes. Considering down-regulated probes for each comparison, we observed an enrichment in biological processes related to a wide variety of DNA, RNA, and protein processes (purine and pyrimidine metabolism, response to DNA damage, DNA replication, nucleotide and base exchange repair, mismatch repair and homologous recombination, RNA degradation, and amino acid metabolism), cell response to chemical and stress stimuli, immune response, and p53 and insulin-related pathways (phosphatidyl inositol system and metabolism) (Additional file 9). Concerning GO terms enriched

Table 2 FatiScan gene set enrichment analysis

Gene Ontology term	WT vs Pax8 adj <i>p</i> -value	Scramble vs Pax8 adj <i>p</i> -value
Translation (GO:0006412)	7.10E-12	1.91E-09
Response to external stimulus (GO:0009605)	2.20E-05	2.02E-07
Response to wounding (GO:0009611)	2.20E-05	6.87E-05
Cellular component movement (GO:0006928)	4.97E-03	6.87E-05
Response to hormone stimulus (GO:0009725)	2.86E-02	1.24E-04
Immune response (GO:0006955)	9.08E-11	1.42E-04
Cell adhesion (GO:0007155)	8.00E-03	6.95E-04
Response to steroid hormone stimulus (GO:0048545)	2.39E-03	1.99E-03
Antigen processing and presentation (GO:0019882)	2.00E-05	3.13E-03
Cell migration (GO:0016477)	3.16E-03	3.65E-03

Most significant Gene Ontology (GO) terms overrepresented in both expression array comparisons. adj *p*-value: adjusted *p*-value.

Table 3 KEGG pathways associated to Pax8 silencing

Global class	KEGG pathway	Scr. vs Pax8 adj <i>p</i> -value	Wt. vs Pax8 adj <i>p</i> -value
Downreg. Phosph. I. probes	Phosphatidylinositol signaling system	1.28E-03	8.10E-05
	Inositol phosphate metab.	4.18E-02	9.88E-04
Aa metab.	Glycine, serine and threonine metab.	1.25E-04	2.42E-02
	Selenoamino acid metab.	1.61E-03	1.16E-02
	Cysteine and methionine metab.	7.21E-03	1.25E-03
	Arginine and proline metab.	1.06E-02	9.73E-07
	Cell cycle	9.67E-05	9.73E-07
CAMs	Cell adhesion molecules	9.37E-03	5.39E-03
Immune response	Antigen processing and presentation	1.56E-05	2.86E-03
	Autoimmune thyroid disease	5.26E-04	2.76E-03
DNA/RNA processes	Purine metab.	1.56E-05	9.52E-09
	Base excision repair	5.85E-05	2.20E-03
	Pyrimidine metab.	1.25E-04	5.86E-09
	Nucleotide excision repair	2.99E-04	3.22E-03
	RNA degradation	9.95E-04	2.76E-03
	Mismatch repair	1.22E-03	4.76E-05
	Homologous recombination	2.30E-02	7.50E-03
	DNA replication	2.88E-02	2.98E-06
	p53 signaling pathway	7.24E-03	7.26E-07
Upreg. probes	Cell processes	1.13E-10	4.66E-14
	Endocytosis	1.23E-06	1.55E-05
Cell migration/adhesion	Lysosome	2.43E-09	1.59E-06
	Cell adhesion molecules	2.43E-09	1.59E-06
Signaling pathways	Cell adhesion molecules	2.43E-09	1.59E-06
	Cytosolic DNA-sensing pathway	4.36E-04	5.70E-06
	NOD-like receptor signaling pathway	2.59E-03	9.17E-05
	Toll-like receptor signaling pathway	4.26E-06	3.52E-07
Cancer	Chemokine signaling pathway	1.91E-05	9.22E-06
	MAPK signaling	7.52E-06	4.69E-07
	Thyroid cancer	1.65E-02	1.23E-04
	Prostate cancer	2.30E-05	4.74E-07
	Endometrial cancer	8.49E-04	1.49E-05
	Pancreatic cancer	1.34E-05	7.79E-06

Table 3 KEGG pathways associated to Pax8 silencing
(Continued)

	Renal cell carcinoma	1.95E-03	9.22E-06
	Colorectal cancer	1.16E-03	4.71E-05
	Pathways in cancer	5.20E-06	2.07E-10
Immune response	Viral myocarditis	2.49E-11	2.68E-08
	Graft-versus-host disease	1.53E-09	5.16E-07
	Allograft rejection	9.99E-08	4.28E-06
	Autoimmune thyroid disease	2.53E-08	1.59E-06
	Antigen processing and presentation	1.13E-10	5.06E-13

Most significant KEGG pathways enriched among common downregulated (n = 633) and upregulated (n = 565) probes for both expression array comparisons. Downreg.: Downregulated; Upreg.: Upregulated; adj *p*-value: adjusted *p*-value; Phosph.I.: Phosphatidylinositol; Aa: Amino acid; metab.: metabolism.

amongst up-regulated probes, it is worth to mention the over-representation of genes involved in biological processes such as immune response, cell response to stimuli, apoptosis and cell death, cell motion/migration/adhesion, and regulation of cell differentiation (Additional file 10).

Table 3 and Additional file 11 depict the most significant and complete set of KEGG pathways overrepresented in under and overexpressed target genes, respectively. KEGG pathways significantly enriched in these Pax8-regulated genes included vesicle-related terms (endocytosis, rno004144; lysosomes, rno004142), DNA/RNA events, cell cycle, cell-cell interactions (focal adhesions, adherens junctions), cancer-related pathways (MAPK, JAK-STAT, p53, ERBB, TGF β , and VEGF), amino acid metabolism, and insulin/inositol phosphate signalling events.

Integrated data reveal a reduced percentage of genes transcriptionally regulated through promoter sequences

To answer the question whether independent Pax8 binding to the genomic regions has functional consequences

through changes in the expression level of target genes, the ChIP-Seq data were integrated with the gene expression profiling data. As shown in the Venn diagram (Figure 6), 78 differentially expressed probes (29 and 49 up and down-regulated, respectively, in the siPax8 PCCl3 condition) representing 54 *loci* were associated with genes showing a significant peak around \pm 1 kb from a TSS. This number of genes represents 6.4% (54 out of 849 genes) of the significantly associated genes identified by expression arrays (Additional file 5). This small overlap can be explained by indirect effects of Pax8 or by the binding of Pax8 to “orphan” CGI regulatory elements, also sites of transcriptional initiation but not related with TSSs or promoter regions [11]. It is worth mentioning that we identified neighbouring genes showing significantly altered expression according to our expression data, which could be simultaneously regulated by a unique Pax8 binding site; for example, the closely positioned genes *Padi1* and *Padi3* (peptidyl arginine deiminase, types I and III) on chromosome 5, and *Mplh* (melanophilin) and *Rab17* on chromosome 9 (Additional file 12).

Independent validation confirms significant findings defined by ChIP-seq and expression arrays

We performed experimental validations using independent immunoprecipitated and siRNA silenced PCCl3 samples, as well as their corresponding controls. Among the genes included for this validation were: *Brcal* (breast cancer 1), a well-known tumour suppressor gene involved in the maintenance of genomic stability and related to breast carcinoma development [18]; *Cdh16* (cadherin 16, KSP-cadherin), a member of the cadherin protein family acting as a morphogenic factor for tissue development [19] and recently described to be regulated by Pax8 [20,21]; *Rab17* (a member of the RAS oncogene family) and *Myo5b* (myosin VB), genes previously described to be involved in epithelial vesicle trafficking in highly polarized cells [22,23]; *Dab2ip* (DAB2 interacting protein), a tumour and metastasis suppressor gene which encodes a Ras GTPase-activating protein [24]; *Dio1* (iodothyronine deiodinase, type I), an essential gene

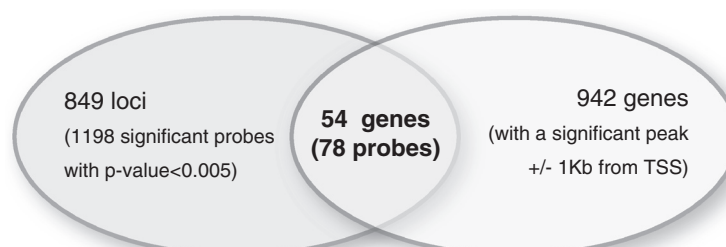


Figure 6 Venn diagram showing the number of significant *loci* obtained for each screening (expression arrays and ChIP-Seq) and for combined analysis. 78 significant probes (29 and 49 up and down-regulated, respectively, in the siPax8 PCCl3 condition) showed a *p*-value < 0.05 in the expression arrays and at least one immunoprecipitated peak within 1 kb of a TSS.

for thyroid hormone action given that it codes for an oxidoreductase involved in thyroid hormone activation by converting the prohormone T4 into bioactive 3,5,3'-triiodothyronine (T3) [25] and *Tmod1* (tropomodulin 1), a gene encoding a protein which inhibits actin filament elongation and that is consequently involved in cytoskeleton structure regulation and cell morphology [26]. As shown in Figure 7A, after Pax8 chromatin immunoprecipitation followed by semiquantitative RT-PCR, we observed an enrichment of IP regions for all the above-mentioned validation targets in comparison with both non-IP samples and input samples.

In addition, Pax8 silencing by means of transient transfection of siRNA was significantly associated with decreased expression levels of these potential targets (Figure 7B, upper pannel), thus demonstrating a direct transcriptional effect of Pax8 on these genes. mRNA expression validation was also done for several genes that were upregulated in the absence of Pax8, including the genes encoding: *CCL2*, a chemokine involved in thyroid autoimmunity [27]; *S100A4*, a calcium-binding protein which plays a role in angiogenesis, extracellular matrix remodelling and tumor microenvironment, and reported to be overexpressed in metastatic papillary thyroid

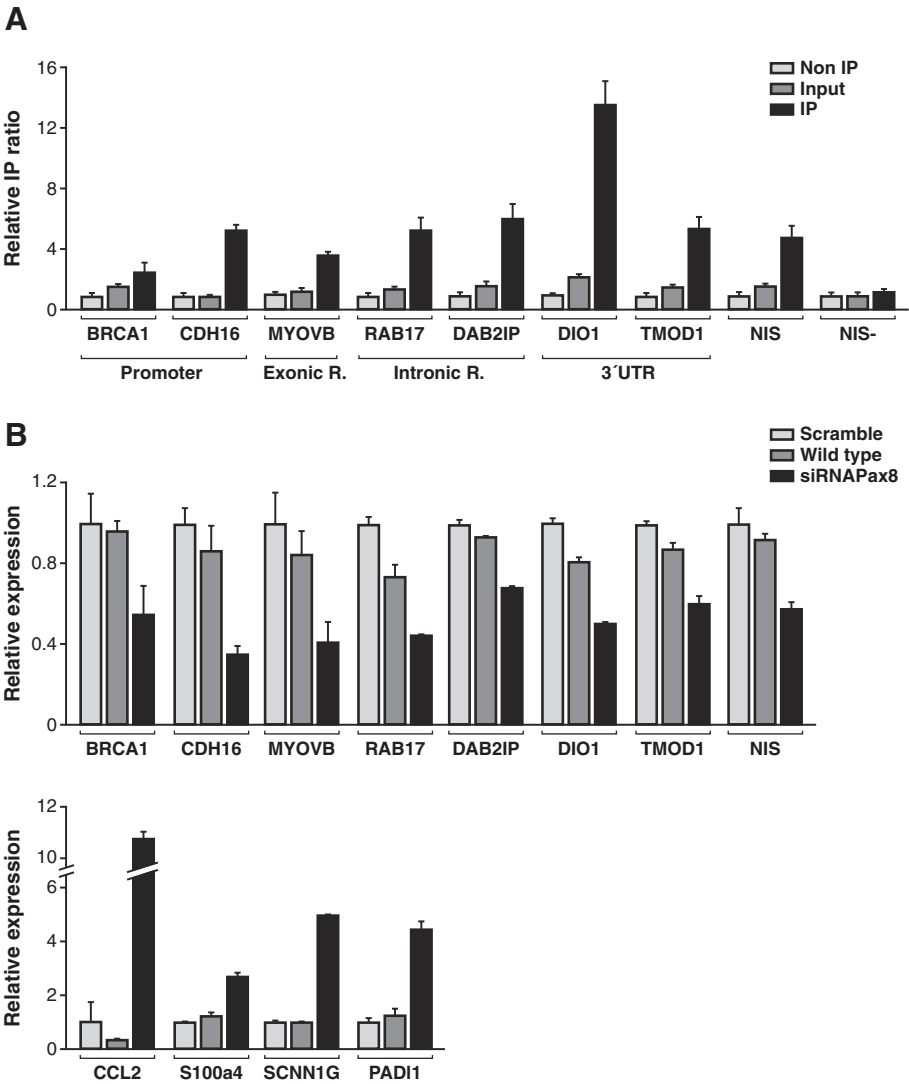


Figure 7 Experimental validation of ChIP-Seq. A) Normalized IP ratio (arbitrary units) of corresponding DNA sequences belonging to significant peaks of 7 representative genes found in the present analysis. The NUE element of rat *Nis* (NIS) was used as a positive control while an unspecific sequence of the same *Nis* promoter (NIS-) was used as a negative control. **B)** Relative expression assessed by means of qRT-PCR of 7 (upper pannel) and 4 (lower pannel) genes differentially down- and upregulated in Pax8-silenced PCC13 cells (siRNA Pax8) vs. wild type (wt)/siScramble (Scramble) cells, respectively. As a Pax8-dependent positive control, we evaluated *Nis* mRNA expression levels.

microcarcinomas [28]; SCNN1G and PADI1, which exert a role in Na⁺ transport and differentiation in epithelial cells, respectively [29,30] (Figure 7B, lower panel). *In silico* analysis of significant IP peaks located along promoter areas of these *loci* demonstrated Pax8 potential binding sites in 3 out of 4 genes (data not shown). Globally, these findings underscore the efficiency and accuracy of ChIP-Seq and expression array technologies to define a Pax8-dependent gene network, which allowed us to identify biological functions of Pax8 in thyroid cells.

Discussion

Despite the known relevance of the transcription factor Pax8 for adult thyrocyte physiology, few data have been published concerning Pax8 target genes other than key thyroid-related genes (*Tg*, *Tpo*, and *Nis*). The transcriptional output of Pax8 during thyroid development is unknown but essential, given that thyroid follicular precursors are not formed in *Pax8* null mouse embryos, which ultimately impairs the formation of follicle structures and thyroid hormone biosynthesis [5].

With regard to its link to tumour development, *Pax8* expression decreases or is lost in follicular thyroid carcinomas as well as in oncogene-transformed thyroid cells [31]. Moreover, several well-known tumour suppressors, including *TP53* [32] and *WT1* [33], have been defined as Pax8 targets, and cytoplasmic Pax8 staining has been positively associated with tumour size, metastasis, local invasion, recurrence, or persistence in the thyroid [34]. Taking into account all these premises, and in order to better understand the role of Pax8 in the maintenance of thyroid function, we decided to explore the transcriptional profile of Pax8-silenced thyroid PCCL3 cells, and to integrate these signals with genome wide cis-regulatory studies. Thus, our experimental design combined putative and novel Pax8 binding sites with analysis of actual target gene expression regulation, a strategy successfully used for identifying direct targets for other transcription factors [35,36].

Our unbiased mapping of Pax8 binding sites along the rat genome has identified a large number of DNA sequences that are occupied in living thyrocytes. Moreover, this is the first study addressing *in vivo* genome-wide mapping of Pax8-DNA binding sites, and the Pax8 consensus binding motif here defined encompasses motifs described by previous reports focused either on single gene regulation [7,12] or on Paired-box DNA motif characterization [13,14]. The ChIPSeq approach also led to significant immunoprecipitation of genomic sequences containing CpG islands, as well as CpG dinucleotides. Extensive literature has linked the location of CpG islands and GC-enriched regions to transcriptionally

permissive chromatin [37,38], which could lend support to a relevant role of Pax8 in the transcriptional output of the thyrocyte. About half of all CpG islands self-evidently contain TSSs, while the other half (known as “orphan” CpG islands) are either within or between characterized transcription units and have unknown significance [11,38]. Despite a lack of association to annotated promoters, “orphan” CpG islands have been associated to transcriptional initiation and dynamic expression during development [39]. In agreement with this, we found significant Pax8 binding to orphan CpG islands in intronic regions and a preferential binding to such islands 10–100 kb upstream or downstream of a transcription start site. In fact, genomic studies indicate that almost half of the human coding genes have alternative promoters [40] and that transcription factor binding sites (TFBSs) in classically defined promoter regions may represent a minority of genomic binding sites [41]. Moreover, this latter report clearly demonstrated an association between TFBSs and the expression of non-coding RNAs, which could be modulating the expression of the gene encoded by the opposite strand. Less directly, a subset of intergenic H3K4me3 peaks, many of which are likely to correspond to orphan CpG islands, were found to represent TSSs for long non-coding RNAs [42]. Our findings suggest that Pax8 binds orphan CpG islands that could represent alternative promoters of nearby annotated genes [43] or ncRNAs that regulate gene expression.

Otherwise, Pax8-dependent ChIP-Seq data demonstrated an enrichment of genomic regions with overrepresentation of general transcriptional regulatory elements (Human MTE and Drosophila MTE, Inr-DPE and BRE). MTE constitutes a core promoter element (~20-30 nt downstream of the TSS) associated with RNA polymerase II-mediated transcription [44,45]. Furthermore, human orphan CpG islands have been associated with RNA polymerase II binding sites [39]. On the other hand, Inr-DPE and BRE elements represent functional binding sites for TFIIB and TFIID (transcription initiation factor IIB and IID, respectively), which are main components of the basal transcription machinery [46]. Interestingly, Jin *et al* recently described synergistic MTE-Inr-BRE transcriptional modules in more than 9,000 orthologous mouse and human genes [47]. Whereas functional experiments should be performed to demonstrate an interaction of Pax8 with these general core elements, our data underscore the importance of synergistic interactions between core promoter elements and tissue-specific TFs to ultimately modulate gene expression.

Potential Pax8 partners in transcriptional regulation

Apart from the classical view of TFs interacting with promoter regions, TFs could activate gene expression by interacting with common lineage-specific TFs and/or binding to distal regions (enhancers). Synergistic effects of Pax8 and AP1 proteins have been shown to occur in

the regulation of *Nis* transcription through interaction along the NUE element [7], and AP1 and PAX proteins also interact to cooperate in the modulation of transcription of other genes [16]. Accordingly, we observed an overrepresentation of binding motifs related to NRF-1 (Nuclear respiratory factor-1), and several AP1 members (c-FOS, BATF3, and c-JUN) were differentially expressed in Pax8-deprived thyroid cells. However, no significant findings were obtained for other transcription factors described to act synergistically with Pax8, such as Nkx2-1 and TAZ/WWTR1 proteins [48], indicating that this cooperative transcriptional role could be restricted to specific *loci* rather than representing a global transcription phenomenon in thyroid cells.

Functional studies described in the present paper confirmed physical *in vivo* interactions between Pax8 and CTCF or Sp1 in thyrocytes. These novel partners were further demonstrated to modulate the effect of Pax8 on the transcription of the *NIS* gene, thus confirming that these interactions are functionally relevant. Evidence has been accumulating concerning the role of CTCF in the establishment of intra-chromosomal loops which ultimately mediate protein-protein contacts between distal complexes and the general transcription machinery [49,50]. On the other hand, Sp1 is a ubiquitously expressed transactivator, which physically interacts with several components of TFIIB and TFIID (mentioned above as potential Pax8 interacting proteins) and factors related to epigenetic events, such as histone deacetylases and p300/CBP histone acetyltransferase [51]. Interestingly, several studies have described synergistic interactions between Pax8 and p300 acetyltransferase for enhancing the transcriptional activity of thyroid-related genes [52,53]. Taking into account this complete transcriptional scenario, our data describe potential interactions of Pax8 with both common TFs and core elements, which could cooperate in chromatin remodeling for transcriptional regulation in thyroid cells.

Identification of biological processes controlled by Pax8 in thyroid cells

Pax8 has been mainly associated to thyroid differentiation and development through its transcriptional role in key thyroid-related genes [54,55]. At this regard, we observed a downregulation of *DIO1* after abolishing Pax8 (Additional file 5), which potentially binds to a critical region for selenocystein insertion in the *DIO1* mRNA. Data were recently provided indicating that TSH tightly regulates *DIO1* expression in thyroid cells through Pax8-dependent *DIO1* mRNA stabilization (S.G. Leoni; unpublished observations). Moreover, gene expression profiling in normal versus malignant thyroid tissues demonstrated a downregulation of *DIO1* and *DIO2* [56], which could be linked to Pax8 loss during cancer progression.

Intriguingly, Pax8 modulates the expression of several genes involved in carcinogenesis and thyroid malignancies (phosphatidylinositol/insulin and MAPK pathways) and cell cycle processes (*CDKN2B*, *CCNB1* and *CCNB2*, among others) (Additional file 11). These findings are in accordance with previous studies in which Pax8 expression was abolished in the differentiated thyroid cell line FRTL5 [20,57]. Our data would also explain the biological mechanism underlying the partial decrease in thyrocyte proliferation in response to both IGF-I and TSH (main regulators of thyroid proliferation and differentiation) after both *Nkx2.1* and *Pax8* mRNA silencing [57].

DNA-related biological processes involved a plethora of functional categories (replication, repair and metabolism), highlighting the novel finding of *Brca1*-dependence on Pax8. In this regard, Shih *et al* described that *BRCA1* and *BRCA2* germline mutations were twice as common in individuals developing a second non-ovarian carcinoma, with follicular thyroid carcinoma being one of the most frequent secondary tumours [18]. This finding can be of great relevance in the development of sporadic thyroid tumors, given that, as mentioned before, *Pax8* expression is decreased or lost in thyroid tumours.

Recent reports have associated the transcription factors Pax2 and Pax5 with increased capabilities for cell motility and adhesion in human cancer [58,59]. In parallel with these Pax-related functions, we observed significant expression changes of *loci* involved in cell motion/adhesion, notably the Pax8 effect on *NCAM1* (neural cell adhesion molecule 1) transcription. NCAM1 and other components of adherens junctions, such as cadherins, have been described to be essential for maintaining cell polarity and epithelial integrity [60]. Interestingly, Cadherin-16 (*Cdh16*/Ksp-cadherin) was recently proposed to play a TSH-regulated role in thyroid development [61], and its expression and promoter activity is controlled by Pax8 [20,62]. We have not only confirmed transcriptional regulation of *Cdh16* by PAX8, but also defined additional PAX8-dependent genes that could be essential for thyroid cell polarity (*MYO5b* and *Rab17*, among others). In this regard, germline mutations in *MYO5b* have been associated with disruption of epithelial cell polarity in MVID (MIM251850) [23]. This role is exerted via its involvement in vesicle trafficking through direct interactions with Rab GTPase proteins, such as RAB11a and RAB8a. Further functional studies should be performed to evaluate potential Myo5b interactions with RAB17, another Rab GTPase protein involved in membrane trafficking and confirmed as a Pax8 target in the present study.

Conclusions

State-of-the-art cis-regulatory sequencing studies have been combined with mRNA silencing and expression arrays to further characterize the functional relevance of TF-

interacting DNA regions and thus to define their transcriptional output. In our study, we describe Pax8 as a master regulator of key cellular processes for thyrocyte biology, including cell cycle regulation, DNA repair, replication and metabolism, and cell polarity, and define a large set of genes whose expression is modulated by Pax8. However, only a minor fraction (6.4%) of the Pax8 binding sites identified are close to TSSs and correlate with altered mRNA expression, in agreement with studies carried out on other TFs (1-10%) [35,36]. This moderate percentage may be explained by the Pax8 binding site distribution, where most of the binding sites are related with orphan CGI regions. In this regard, our study demonstrates Pax8 binding sites in regions distal to TSSs, preferentially in intronic regions, which highlights a potential role as a distal or alternative transcriptional regulator, although this does not rule out indirect regulation. Distal regulation by Pax8 is supported by the interaction with chromatin remodeling factors such as CTCF and Sp1 described in the present study. Therefore, these findings suggest a new function of Pax8 as a chromatin remodeling factor in thyroid follicular cells, which should be validated and elucidated in future studies.

Methods

Cell culture and plasmids

PCCL3 cells are a continuous line of thyroid follicular cells derived from Fischer rats that express the thyroid-specific genes *Tg*, *Tpo*, and *Nis*, as well as the thyroid-specific transcription factors Nkx2.1, Foxe1, and Pax8 [63]. They were grown in Coon's modified Ham's F-12 medium supplemented with 5% donor calf serum and a six-hormone mixture [64]. For transfection assays, HeLa cells were used and cultured as described [65].

The 2,854-bp DNA fragment of the rat *Nis* promoter (pNIS-2.8) which contains the NUE region with two Pax8 binding sites was cloned in our laboratory [17]. Full length Pax8, Sp1, and CTCF were subcloned respectively in pcDNA3.1+, pBS and pcDNA1 Neo, and have been previously described [66-68].

Chromatin immunoprecipitation

ChIP samples were prepared from PCCL3 cells as follows: cultures of 10×10^6 cells were cross-linked with 1% formaldehyde for 10 minutes at room temperature. Cross-linking was stopped by the addition of glycine to a final concentration of 125 mM, and cells were washed twice with PBS. The cell pellet was resuspended consecutively in ChIP lysis buffers [69] and sonicated for 90 minutes (30 seconds high frequency pulsing followed by 30 seconds resting) using the Bioruptor sonicator (Diagenode, Denville, NJ) to produce chromatin fragments of 200–500 bp on average. After isolating the sheared chromatin, we incubated it with Pax8 antibody-coated magnetic beads. To prepare these beads, 100 μ l of magnetic sheep

anti-rabbit IgG beads (Invitrogen, Carlsbad, CA) were incubated overnight with 10 μ g polyclonal anti-mouse Pax8 antibody (Biopat, Milan, Italy), that recognizes also rat Pax8 at 4°C. The following day, the beads were rinsed and added to the sheared chromatin and incubated overnight at 4°C. Samples were then rinsed five times with RIPA buffer, and the antibody was stripped from the beads by incubating in 1% SDS at 65°C for 15 minutes; cross-linking was reversed by incubating overnight at 65°C. The next day, samples were sequentially treated with RNase A and Proteinase K, phenol-chloroform extracted, ethanol precipitated in the presence of 20 μ g glycogen, and resuspended in 50 μ l 10 mM Tris pH 8.0. Procedure controls included an input condition, obtained before DNA-protein complex sonication and further used during ChIP-Seq assays as normalization sample, and non-immunoprecipitated DNA (non-IP DNA), which was obtained just prior to Pax8 immunoprecipitation.

Before sequencing, Pax8-IP DNA (IP) was used to confirm enrichment of target DNA fragments (Additional file 13) by means of real time-PCR, using as positive IP controls both the *Nis* upstream enhancer element (NUE) and *Tpo* promoter sequences [7,9]. Negative controls of Pax8 binding to genomic DNA included promoter areas of *Gad1* (glutamate decarboxylase 1) and *Afm* (afamin or alpha-albumin), and a region of the *Nis* locus that does not bind Pax8. PCR reactions were assembled in triplicate with SYBR Green ER qPCR Supermix (Invitrogen, Carlsbad, CA) and run on an Applied Biosystem 7500 Real Time PCR system. The enrichment of target sequences in ChIP material was calculated relative to the *Afm* negative control, and normalized to their relative amplification in non-IP DNA.

Illumina high-throughput sequencing

After verifying Pax8 target enrichment, IP and non-IP DNAs were modified for sequencing following the ChIP-Seq manufacturer's protocol (Illumina, San Diego, CA). Briefly, DNAs were blunted with a combination of T4 DNA polymerase, Klenow polymerase, and T4 PNK. Then, a single 3'-end "A" base was added using Klenow exo (3'-to-5' exo minus). Adapters provided by Illumina were ligated to the ends of the modified DNA before size selection of 200-bp fragments via polyacrylamide gel electrophoresis followed by extraction. The isolated DNA samples were used as the template for amplification by 18 cycles of PCR, and used for cluster generation on the Illumina Genome Analyzer II. Amplified products were column-purified with the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Dusseldorf, Germany) and assayed for quantity and quality with the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

The 50 bp sequence reads were aligned to the rat genome (rn4; NCBI build 4) using the MIRO pipeline

(Centre for Genomic Regulation, Barcelona, Spain) allowing 2 mismatches, and aligned tags were converted to BED format and used for identification of binding sites. In order to visualize the data in the University of California Santa Cruz genome browser (<http://genome.ucsc.edu>), the sequence reads were directionally extended to 300 bp, and for each base pair in the genome the number of overlapping sequence reads was determined and averaged over a 10 bp window. All sequencing data can be downloaded from Gene Expression Omnibus (GEO) under accession number GSE26938.

Peak finding and data analysis

MACS program (Model-based Analysis for ChIP-Seq, v.1.4.1) was used with default parameters to determine enriched Pax8 binding regions using non-IP DNA as control. PeakAnalyzer software [70] was assessed to identify functional elements proximal to the immunoprecipitated peaks using the annotation of the Ensembl release 63 [71] on the RGSC genome assembly v3.4.

The distance correlation analysis was done with the GenomeInspector tool of the Genomatix suite (Genomatix Software GmbH, Munich, Germany), within ± 10 Kb from the middle of the CpG islands and simple nucleotide repeats. CpG islands and simple nucleotide repeat coordinates were obtained from the UCSC Genome Browser [72].

Motif search

We used two approaches for motif search in the Pax8 binding sites defined by MACS. The first method, based on MEME-ChIP [73] and focusing on the central 100 bp portion of each sequence, was used for the 500 peaks with the best FDR. The TOMTOM program was used to compare known transcriptional motifs with the motifs identified by MEME-ChIP [74]. On the other hand, the RegionMiner tool of the Genomatix suite (Genomatix Software GmbH, Munich, Germany) identified the most over-represented motifs, based on the background of occurrences of the transcription factor binding sites (TFBSs) within the whole sequence of the rat genome (rn4; NCBI build 4); we compared these to the Pax8 binding regions identified by MACS. The motifs were ranked by the Z-score/fold change to obtain the most relevant sites [15].

Coimmunoprecipitation assays

Polyclonal antibodies (1 μ g) were bound to Dynabeads (Invitrogen, Carlsbad, CA) and incubated with 200 μ g of nuclear proteins extracted as described [75] from PCCL3 thyroid cells. The incubation was performed in 300 μ l of Immunoprecipitation (IP)

buffer (20 mM HEPES pH 8, 10 mM KCl, 0.15 mM EGTA, 0.15 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.1% NP-40 with a cocktail of protease inhibitors (Roche, Mannheim Germany)). After washing with IP buffer, proteins were eluted in 20 μ l of Laemmli sample buffer and boiled for 10 minutes. The immunocomplexes were analyzed by SDS-PAGE and then immunoblotted using anti-Pax8 (BioPat, Milan Italy) and anti-Sp1 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) antibodies. In the case of CTCF and prior to CoIP, we transfected into PCCL3 cells an expression vector containing the full-length human CTCF, as the antibody used (Upstate Biotechnology, Waltham, MASS) recognized the human form more specifically.

Promoter activity assays

HeLa cells were transiently transfected using calcium phosphate with 1 μ g of pNIS-2.8 reporter alone or in combination with 0.5 μ g of expression vectors for Pax8, Sp1 and CTCF as indicated in the text. The Renilla luciferase-encoding pRL-CMV vector (50 ng) was used to correct for transfection efficiency. Forty-eight hours after transfection cells were harvested, lysed, and analyzed for firefly and renilla luciferase activities by the Dual-Luciferase reporter assay system (Promega, Madison WI). Promoter activity was determined as the ratio between firefly and renilla luciferase and represented as relative luciferase activity. The results were expressed as the mean \pm SD of three independent experiments, each performed in triplicate. Data were analyzed with GraphPad Prism (Intuitive Software for Science, San Diego, CA). Statistical significance was determined using an Anova one-way test, and differences were considered significant at a $P < 0.05$.

Expression arrays

The Pax8-dependent gene expression study was performed in differentiated PCCL3 thyroid cells by means of expression arrays (Agilent rat whole genome 44 K arrays). For this purpose, we generated three different conditions to finally establish two main comparisons: wild type vs. Pax8-silenced PCCL3 cells (siPax8 PCCL3), and scrambled siRNA-treated (siScramble PCCL3) vs. Pax8-silenced PCCL3 cells. Given that each comparison was performed using quadruplicates and dye-swaps (Cy3 and Cy5 fluorochromes), our experimental design included sixteen independent competitive hybridizations (Additional file 14).

Transient transfections of PCCL3 cells were performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA), both for scrambled and for Pax8 siRNA conditions (10 ng siRNA /ml) (Dharmacon, Denver, USA). Pax8 silencing was tested by means of western blotting using a polyclonal Pax8 mouse antibody (Biopat, Milan, Italy) at

different time points (24 and 48 hours) after transfection (Additional file 15). Once the 48 hours condition was defined as the best time point for Pax8 silencing, we performed additional transfections to isolate total RNA using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) for each condition considered (*siPax8*, scrambled siRNA and PCCl3 cells treated with lipofectamine) following the manufacturer's recommended protocol. RNA quality was evaluated with the Agilent 2100 Bioanalyzer and later amplified and labelled by using the Low RNA Input Linear Amplification Kit PLUS, Two-Color (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Briefly, for each sample 2 µg of total input RNA were amplified in two rounds of amplification following the manufacturer's instructions. First strand cDNA synthesis and amplification reactions were carried out using random and T7 primers, respectively. During the 2-hour *in vitro* transcription, Cy3- or Cy5-labeled CTP was incorporated into each amplified RNA (cRNA). Products of the reaction were then purified using RNeasy mini spin columns (Qiagen, Dusseldorf, Germany). Hybridization and slide and image processing were carried out according to the manufacturer's instructions (Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis protocol). In each experiment, 825 ng of contrasting cRNA samples were fragmented at 60°C for 30 min and hybridized at 65°C for 17 hr. The slides were scanned at a 10 µm resolution using the Agilent G2565BA Microarray Scanner (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Signal quantification was carried out with Feature Extraction 9.1 software (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), using default analysis parameters for Agilent's whole rat genome 44 K gene expression arrays. Array data were normalized using loess and quantile methods for normalization within and between arrays, respectively. Differential expression analysis was done using Bioconductor's limma package. At a later stage, we used the annotate package and the data base rgug4131a.db to obtain the annotations of the rat genome from Agilent. Genes that showed adjusted *p*-values <0.005 were considered differentially expressed both in wild type vs. *siPax8* cells and in *siScramble* PCCl3 vs. *siPax8* PCCl3 cells. Functional analysis of Gene Ontology (GO) terms was carried out using the FatiGO tool and gene set enrichment analysis was performed using FatiScan [76,77]. All microarray data can be downloaded from the Gene Expression Omnibus (GEO) under accession number GSE26938.

Experimental validation for ChIP-seq and expression array data

Technical validations were performed by means of real-time PCR to verify the Pax8-dependency of 7 *loci*, which showed significant results for both expression profiling and ChIP-Seq, independently of the peak location along

the considered gene. After performing an independent Pax8-chromatin IP, we obtained genomic DNA from IP, non-IP, and input samples, which were further used to amplify specific fragments contained in IP peaks (Additional file 13). The immunoprecipitation ratio for IP peaks was estimated comparing IP versus non-IP amplification values using as normalizing regions those mentioned above (*Gad1* and *Afm*), which were confirmed as negative controls by the ChIP-Seq results.

siRNA transfection was done to obtain cDNA for each of the three conditions initially considered for expression profiling (*Pax8* siRNA, scrambled siRNA, and wild type PCCl3 cells). Expression level changes were defined in 7 down-regulated genes and in 4 up-regulated genes by means of real-time PCR for fragments specifically amplifying transcripts of interest (Additional file 16), using GAPDH as a control for target gene expression normalization.

Additional files

Additional file 1: (A). Pax8 chromatin immunoprecipitation validation performed to confirm enrichment of target DNA fragments by means of real-time PCR. Sequences belonging to the *Nis* upstream enhancer element (NUE) [7] and *Tpo* promoter sequences [9], previously described as Pax8 binding sites in rat thyroid cells, were used as positive controls. (B). ChIP-Seq results with regard to the *Nis* locus were visualized in the UCSC genome browser. Significant immunoprecipitated peak corresponding to MACS program included the *Nis* upstream enhancer (NUE), previously described to be regulated by Pax8 (underlined red letters).

Additional file 2: ChIP-Seq MACS data: Excel file containing genomic coordinates of 13,151 rat genomic regions significantly immunoprecipitated according to the MACS ChIP program.

Additional file 3: ChIP seq peaks used for MEME/TOMTOM consensus motif analysis: Genomic coordinates of the 500 most significant ChIP peaks used to verify Pax8-dependent immunoprecipitation and to delineate the consensus Pax8 DNA binding site.

Additional file 4: DNA binding motifs overrepresented in Pax8 IP peaks. Genomatrix matrices significantly associated to Pax8 MACS peaks. *Overrepresentation (genome)* column represents overrepresentation values of these matrices in our IP peaks compared to their presence along the rat genome, and *Z-Score (genome)* column indicates association value of Pax8-immunoprecipitated DNA for each considered DNA matrix.

Additional file 5: Expression data of wt and scrambled conditions vs. siPax8 conditions and association with ChIP-Seq data. Common probes (+/- 1kb) Excel sheet includes expression data for the 78 probes common to both expression comparisons (wt and siScramble conditions vs. siPax8; *p*<0.005) and belonging to genes showing a significant IP peak within 1kb of a TSS. Additional Excel sheets include significant probes for each array comparison.

Additional file 6: FatiScan gene set enrichment analysis. Excel file containing Gene Ontology (GO) terms commonly overrepresented in both expression array comparisons (datasheet "Common GO terms") and their adjusted *p*-values. This file also contains datasheets showing GO terms statistically significant for each individual comparison (WT or SCR sign GO biol. process).

Additional file 7: FatiScan gene set enrichment analysis for scrambled and wild type conditions vs. siPax8 conditions. FatiScan image showing enriched GO terms in siScramble vs. siRNA^{Pax8} and wt vs. siRNA^{Pax8} comparisons, respectively.

Additional file 8: FatiScan gene set enrichment analysis for scrambled and wild type conditions vs. siPax8 conditions. FatiScan image showing

enriched GO terms in siScramble vs. siRNAPax8 and wt vs. siRNAPax8 comparisons, respectively.

Additional file 9: Significant biological processes among underexpressed probes. Fatigo images showing overrepresented biological processes among common downregulated (n=633) probes for both expression array comparisons.

Additional file 10: Significant biological processes among overexpressed probes. Fatigo images showing overrepresented biological processes among common upregulated (n=565) probes for both expression array comparisons.

Additional file 11: Overrepresented KEGG pathways among under- and overexpressed probes. KEGG pathways enriched among common downregulated (n=633) and upregulated (n=565) probes for both expression array comparisons.

Additional file 12: UCSC genome browser images showing significant Pax8 IP peaks for closely positioned *loci* which were detected to be significantly deregulated in expression arrays (p<0.005).

Additional file 13: Oligonucleotides used for immunoprecipitation validation prior to performing high throughput sequencing (including positive and negative Pax8 immunoprecipitation controls), or for experimental validation of ChIP-Seq

Additional file 14: Schematic representation of experimental design followed for whole genome rat expression arrays. Both comparisons (PCC13-siPax8 vs. PCC13-wt and PCC13-siPax8 vs. PCC13-siScramble) included four different biological replicates that were cross-labelled with either Cy3 or Cy5.

Additional file 15: Immunoblot demonstrating Pax8 downregulation in siPax8 conditions (siPax8) versus control conditions, including the no transfection condition (wt) and siScramble PCC13-transfected cells (siScramble). Time points include 24 and 48 hours.

Additional file 16: Oligonucleotides used for experimental validation of expression arrays.

Abbreviations

TFs: transcription factors; ChIP-Seq: Chromatin immunoprecipitation followed by massive sequencing; IP: immunoprecipitated sample; Non-IP: non-immunoprecipitated sample; MACS: Model-based Analysis for ChIP-Seq; CpG: CpG island; GO: Gene Ontology.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

We thank Dr. Vassart (Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium), Dr. Angel Pascual (Instituto Investigaciones Biomédicas, Madrid Spain) and Dr. Colin Goding (Ludwig Institute for Cancer Research, UK) for kindly providing the Pax8, Sp1 and CTCF expression vectors, respectively, and Dr. Ronald Hartong for his criticisms and linguistic assistance.

Funding

We acknowledge the support of Grants BFU-2010-16025 from the Dirección General de Proyectos de Investigación; RD06/0020/0060 from FIS, Instituto de Salud Carlos III, and S2011/BMD-2328 TIRONET project from the Comunidad de Madrid (Spain).

S. Ruiz-Llorente holds a postdoctoral fellowship of the Instituto de Salud Carlos III (Contrato Postdoctoral de Perfeccionamiento; CD05-0055). A. Sastre-Perona holds a predoctoral fellowship from the Formación Personal Universitario (FPU) program. C. Montero-Conde holds a postdoctoral fellowship of the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN; BMED2008-0659).

Author details

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y Universidad Autónoma de Madrid (UAM), C/Arturo Duperier 4, Madrid 28029, Spain. ²Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY10065, USA. ³Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid, Spain. ⁴Department of Molecular Biology, Faculty

of Science, Nijmegen Centre of Molecular Life Sciences, Radboud University, Nijmegen, HB6500, The Netherlands.

Authors' contributions

SRL conceived, designed, and carried out experiments and wrote the manuscript. ECSP designed and carried out analyses and wrote the manuscript. ASP carried out coimmunoprecipitations, luciferase and qRT-PCR assays. CMC carried out analysis of microarray data. GGRP assisted in bio-informatics analysis including peaks mapping. JF participated in manuscript preparation. AV participated in manuscript preparation. DGP supervised and participated in manuscript preparation. PS supervised, participated in manuscript preparation and wrote the manuscript.

Public database accession number

Sequencing and gene expression microarray data have been deposited in the GEO database (accession number GSE26938).
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?
token=tjwrbocecmewahm&acc=GSE26938

Received: 3 January 2012 Accepted: 24 April 2012

Published: 24 April 2012

References

- Farnham PJ: Insights from genomic profiling of transcription factors. *Nat Rev Genet* 2009, **10**(9):605–616.
- Santisteban P, Bernal J: Thyroid development and effect on the nervous system. *Rev Endocr Metab Disord* 2005, **6**(3):217–228.
- De Felice M, Di Lauro R: Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms. *Endocr Rev* 2004, **25**(5):722–746.
- Plachov D, Chowdhury K, Walther C, Simon D, Guenet JL, Gruss P: Pax8, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland. *Development* 1990, **110**(2):643–651.
- Mansouri A, Chowdhury K, Gruss P: Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. *Nat Genet* 1998, **19**(1):87–90.
- Macchia PE, Lapi P, Krude H, Pirro MT, Missero C, Chiovato L, Souabni A, Baserga M, Tassi V, Pinchera A, et al: PAX8 mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis. *Nat Genet* 1998, **19**(1):83–86.
- Ohno M, Zannini M, Levy O, Carrasco N, di Lauro R: The paired-domain transcription factor Pax8 binds to the upstream enhancer of the rat sodium/iodide symporter gene and participates in both thyroid-specific and cyclic-AMP-dependent transcription. *Mol Cell Biol* 1999, **19**(3):2051–2060.
- Miccadei S, De Leo R, Zammarchi E, Natali PG, Civitareale D: The synergistic activity of thyroid transcription factor 1 and Pax 8 relies on the promoter/enhancer interplay. *Mol Endocrinol* 2002, **16**(4):837–846.
- Zannini M, Francis-Lang H, Plachov D, Di Lauro R: Pax-8, a paired domain-containing protein, binds to a sequence overlapping the recognition site of a homeodomain and activates transcription from two thyroid-specific promoters. *Mol Cell Biol* 1992, **12**(9):4230–4241.
- Fraizer GC, Shimamura R, Zhang X, Saunders GF: PAX 8 regulates human WT1 transcription through a novel DNA binding site. *J Biol Chem* 1997, **272**(49):30678–30687.
- Deaton AM, Bird A: CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* 2011, **25**(10):1010–1022.
- Esposito C, Miccadei S, Saiardi A, Civitareale D: PAX 8 activates the enhancer of the human thyroperoxidase gene. *Biochem J* 1998, **331**(Pt 1):37–40.
- Pellizzari L, Fabbro D, Lonigro R, Di Lauro R, Damante G: A network of specific minor-groove contacts is a common characteristic of paired-domain-DNA interactions. *Biochem J* 1996, **315**(Pt 2):363–367.
- Czerny T, Schaffner G, Busslinger M: DNA sequence recognition by Pax proteins: bipartite structure of the paired domain and its binding site. *Genes Dev* 1993, **7**(10):2048–2061.
- Ho Sui SJ, Mortimer JR, Arenillas DJ, Brumm J, Walsh CJ, Kennedy BP, Wasserman WW: oPOSSUM: identification of over-represented transcription factor binding sites in co-expressed genes. *Nucleic Acids Res* 2005, **33**(10):3154–3164.
- Planque N, Leconte L, Coquelle FM, Benkhelifa S, Martin P, Felder-Schmittbuhl MP, Saule S: Interaction of Maf transcription factors with Pax-6 results in synergistic activation of the glucagon promoter. *J Biol Chem* 2001, **276**(38):35751–35760.

17. Garcia B, Santisteban P: **PI3K is involved in the IGF-I inhibition of TSH-induced sodium/iodide symporter gene expression.** *Mol Endocrinol* 2002, **16**(2):342-352.
18. Shih HA, Nathanson KL, Seal S, Collins N, Stratton MR, Rebbeck TR, Weber BL: **BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer families with multiple primary cancers.** *Clin Cancer Res* 2000, **6**(11):4259-4264.
19. Thedieck C, Kuczyk M, Klingel K, Steiert I, Muller CA, Klein G: **Expression of Ksp-cadherin during kidney development and in renal cell carcinoma.** *Br J Cancer* 2005, **92**(11):2010-2017.
20. Di Palma T, Conti A, de Cristofaro T, Scala S, Nitsch L, Zannini M: **Identification of novel Pax8 targets in FRTL-5 thyroid cells by gene silencing and expression microarray analysis.** *PLoS One* 2011, **6**(9):e25162.
21. de Cristofaro T, Di Palma T, Fichera I, Lucci V, Parrillo L, De Felice M, Zannini M: **An essential role for Pax8 in the transcriptional regulation of Cadherin-16 in thyroid cells.** *Mol Endocrinol* 2012, **26**(1):67-78.
22. Zacchi P, Stenmark H, Parton RG, Orioli D, Lim F, Giner A, Mellman I, Zerial M, Murphy C: **Rab17 regulates membrane trafficking through apical recycling endosomes in polarized epithelial cells.** *J Cell Biol* 1998, **140**(5):1039-1053.
23. Muller T, Hess MW, Schiefermeier N, Pfaller K, Ebner HL, Heinz-Erian P, Ponstingl H, Partsch J, Rollinghoff B, Kohler H, et al: **MYO5B mutations cause microvillus inclusion disease and disrupt epithelial cell polarity.** *Nat Genet* 2008, **40**(10):1163-1165.
24. Min J, Zaslavsky A, Fedele G, McLaughlin SK, Reczek EE, De Raedt T, Guney I, Strohlic DE, Macconail LE, Beroukhim R, et al: **An oncogene-tumor suppressor cascade drives metastatic prostate cancer by coordinately activating Ras and nuclear factor-kappaB.** *Nat Med* 2010, **16**(3):286-294.
25. Bianco AC, Kim BW: **Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action.** *J Clin Invest* 2006, **116**(10):2571-2579.
26. Nowak RB, Fischer RS, Zoltoski RK, Kuszak JR, Fowler VM: **Tropomodulin1 is required for membrane skeleton organization and hexagonal geometry of fiber cells in the mouse lens.** *J Cell Biol* 2009, **186**(6):915-928.
27. Liu C, Papewalis C, Domberg J, Scherbaum WA, Schott M: **Chemokines and autoimmune thyroid diseases.** *Hormone und metabolische Forschung = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 2008, **40**(6):361-368.
28. Min HS, Choe G, Kim SW, Park YJ, Park do J, Youn YK, Park SH, Cho BY, Park SY: **S100A4 expression is associated with lymph node metastasis in papillary microcarcinoma of the thyroid.** *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2008, **21**(6):748-755.
29. Ying S, Dong S, Kawada A, Kojima T, Chavanas S, Mechin MC, Adoue V, Serre G, Simon M, Takahara H: **Transcriptional regulation of peptidylarginine deiminase expression in human keratinocytes.** *J Dermatol Sci* 2009, **53**(1):2-9.
30. Riepe FG: **Clinical and molecular features of type 1 pseudohypoadosteronism.** *Horm Res* 2009, **72**(1):1-9.
31. Montero-Conde C, Martin-Campos JM, Lerma E, Gimenez G, Martinez-Guitarte JL, Combalia N, Montaner D, Matias-Guiu X, Dopazo J, de Leiva A, et al: **Molecular profiling related to poor prognosis in thyroid carcinoma. Combining gene expression data and biological information.** *Oncogene* 2008, **27**(11):1554-1561.
32. Stuart ET, Haffner R, Oren M, Gruss P: **Loss of p53 function through PAX-mediated transcriptional repression.** *EMBO J* 1995, **14**(22):5638-5645.
33. Dehbi M, Pelletier J: **PAX8-mediated activation of the wt1 tumor suppressor gene.** *EMBO J* 1996, **15**(16):4297-4306.
34. Scouten WT, Patel A, Terrell R, Burch HB, Bernet VJ, Tuttle RM, Francis GL: **Cytoplasmic localization of the paired box gene, Pax-8, is found in pediatric thyroid cancer and may be associated with a greater risk of recurrence.** *Thyroid* 2004, **14**(12):1037-1046.
35. Scacheri PC, Davis S, Odom DT, Crawford GE, Perkins S, Halawi MJ, Agarwal SK, Marx SJ, Spiegel AM, Meltzer PS, et al: **Genome-wide analysis of menin binding provides insights into MEN1 tumorigenesis.** *PLoS Genet* 2006, **2**(4):e51.
36. Yang A, Zhu Z, Kapranov P, McKeon F, Church GM, Gingeras TR, Struhl K: **Relationships between p63 binding, DNA sequence, transcription activity, and biological function in human cells.** *Mol Cell* 2006, **24**(4):593-602.
37. Illingworth R, Kerr A, Desousa D, Jorgensen H, Ellis P, Stalker J, Jackson D, Clee C, Plumb R, Rogers J, et al: **A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci.** *PLoS Biol* 2008, **6**:e22.
38. Illingworth RS, Bird AP: **CpG islands--a rough guide.** *FEBS Lett* 2009, **583**(11):1713-1720.
39. Illingworth RS, Gruenewald-Schneider U, Webb S, Kerr AR, James KD, Turner DJ, Smith C, Harrison DJ, Andrews R, Bird AP: **Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome.** *PLoS Genet* 2010, **6**(9):e1001134.
40. Kimura K, Wakamatsu A, Suzuki Y, Ota T, Nishikawa T, Yamashita R, Yamamoto J, Sekine M, Tsuritani K, Wakaguri H, et al: **Diversification of transcriptional modulation: large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes.** *Genome Res* 2006, **16**(1):55-65.
41. Cawley S, Bekiranov S, Ng HH, Kapranov P, Sekinger EA, Kampa D, Piccolboni A, Sementchenko V, Cheng J, Williams AJ, et al: **Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs.** *Cell* 2004, **116**(4):499-509.
42. Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin MF, Feldser D, Huarte M, Zuk O, Carey BW, Cassady JP, et al: **Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals.** *Nature* 2009, **458**(7235):223-227.
43. Maunakea AK, Nagarajan RP, Bilenny M, Ballinger TJ, D'Souza C, Fouse SD, Johnson BE, Hong C, Nielsen C, Zhao Y, et al: **Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters.** *Nature* 2010, **466**(7303):253-257.
44. Ohler U, Liao GC, Niemann H, Rubin GM: **Computational analysis of core promoters in the Drosophila genome.** *Genome Biol* 2002, **3**(12):research0087.1-0087.12.
45. Lim CY, Santoso B, Boulay T, Dong E, Ohler U, Kadonaga JT: **The MTE, a new core promoter element for transcription by RNA polymerase II.** *Genes Dev* 2004, **18**(13):1606-1617.
46. Juven-Gershon T, Hsu JY, Theisen JW, Kadonaga JT: **The RNA polymerase II core promoter - the gateway to transcription.** *Curr Opin Cell Biol* 2008, **20**(3):253-259.
47. Jin VX, Singer GA, Agosto-Perez FJ, Liyanarachchi S, Davuluri RV: **Genome-wide analysis of core promoter elements from conserved human and mouse orthologous pairs.** *BMC Bioinforma* 2006, **7**:114.
48. Di Palma T, D'Andrea B, Liguori GL, Liguoro A, de Cristofaro T, Del Prete D, Pappalardo A, Mascia A, Zannini M: **TAZ is a coactivator for Pax8 and TTF-1, two transcription factors involved in thyroid differentiation.** *Exp Cell Res* 2009, **315**(2):162-175.
49. Lanctot C, Cheutin T, Cremer M, Cavalli G, Cremer T: **Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions.** *Nat Rev Genet* 2007, **8**(2):104-115.
50. Phillips JE, Corces VG: **CTCF: master weaver of the genome.** *Cell* 2009, **137**(7):1194-1211.
51. Li L, Davie JR: **The role of Sp1 and Sp3 in normal and cancer cell biology.** *Ann Anat* 2010, **192**(5):275-283.
52. De Leo R, Miccadei S, Zammarchi E, Civitareale D: **Role for p300 in Pax 8 induction of thyroperoxidase gene expression.** *J Biol Chem* 2000, **275**(44):34100-34105.
53. Grasberger H, Ringkarnanont U, Lefrancois P, Abramowicz M, Vassart G, Refetoff S: **Thyroid transcription factor 1 rescues PAX8/p300 synergism impaired by a natural PAX8 paired domain mutation with dominant negative activity.** *Mol Endocrinol* 2005, **19**(7):1779-1791.
54. Pasca di Magliano M, Di Lauro R, Zannini M: **Pax8 has a key role in thyroid cell differentiation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**(24):13144-13149.
55. Robson EJ, He SJ, Eccles MR: **A PANorama of PAX genes in cancer and development.** *Nat Rev Cancer* 2006, **6**(1):52-62.
56. Arnaldi LA, Borra RC, Maciel RM, Cerutti JM: **Gene expression profiles reveal that DCN, DIO1, and DIO2 are underexpressed in benign and malignant thyroid tumors.** *Thyroid* 2005, **15**(3):210-221.
57. Rossi DL, Acebron A, Santisteban P: **Function of the homeo and paired domain proteins TTF-1 and Pax-8 in thyroid cell proliferation.** *J Biol Chem* 1995, **270**(39):23139-23142.
58. Buttiglieri S, Deregibus MC, Bravo S, Cassoni P, Chiarle R, Bussolati B, Camussi G: **Role of Pax2 in apoptosis resistance and proinvasive phenotype of Kaposi's sarcoma cells.** *J Biol Chem* 2004, **279**(6):4136-4143.
59. Schebesta A, McManus S, Salvagiotto G, Delogu A, Busslinger GA, Busslinger M: **Transcription factor Pax5 activates the chromatin of key genes involved in B cell signaling, adhesion, migration, and immune function.** *Immunity* 2007, **27**(1):49-63.

60. Albelda SM, Oliver PD, Romer LH, Buck CA: **EndoCAM: a novel endothelial cell-cell adhesion molecule.** *J Cell Biol* 1990, **110**(4):1227–1237.
61. Cali G, Gentile F, Mogavero S, Pallante P, Nitsch R, Ciancia G, Ferraro A, Fusco A, Nitsch L: **CDH16/Ksp-Cadherin Is Expressed in the Developing Thyroid Gland and Is Strongly Down-Regulated in Thyroid Carcinomas.** *Endocrinology* 2012, **153**(1):522–534.
62. de Cristofaro T, Di Palma T, Fichera I, Lucci V, Parrillo L, De Felice M, Zannini M: **An Essential Role for Pax8 in the Transcriptional Regulation of Cadherin-16 in Thyroid Cells.** *Mol Endocrinol* 2012, **26**(1):67–68.
63. Fusco A, Berlingieri MT, Di Fiore PP, Portella G, Grieco M, Vecchio G: **One- and two-step transformations of rat thyroid epithelial cells by retroviral oncogenes.** *Mol Cell Biol* 1987, **7**(9):3365–3370.
64. Costamagna E, Garcia B, Santisteban P: **The functional interaction between the paired domain transcription factor Pax8 and Smad3 is involved in transforming growth factor-beta repression of the sodium/iodide symporter gene.** *J Biol Chem* 2004, **279**(5):3439–3446.
65. Landa I, Ruiz-Llorente S, Montero-Conde C, Inglada-Perez L, Schiavi F, Leskela S, Pita G, Milne R, Maravall J, Ramos I, *et al*: **The variant rs1867277 in FOXE1 gene confers thyroid cancer susceptibility through the recruitment of USF1/USF2 transcription factors.** *PLoS genetics* 2009, **5**(9): e1000637.
66. Vilain C, Rydlewski C, Duprez L, Heinrichs C, Abramowicz M, Malvaux P, Renneboog B, Parma J, Costagliola S, Vassart G: **Autosomal dominant transmission of congenital thyroid hypoplasia due to loss-of-function mutation of PAX8.** *J Clin Endocrinol Metab* 2001, **86**(1):234–238.
67. Courey AJ, Holtzman DA, Jackson SP, Tjian R: **Synergistic activation by the glutamine-rich domains of human transcription factor Sp1.** *Cell* 1989, **59**(5):827–836.
68. Klenova EM, Nicolas RH, Paterson HF, Carne AF, Heath CM, Goodwin GH, Neiman PE, Lobanenko VV: **CTCF, a conserved nuclear factor required for optimal transcriptional activity of the chicken c-myc gene, is an 11-Zn-finger protein differentially expressed in multiple forms.** *Mol Cell Biol* 1993, **13**(12):7612–7624.
69. Lee TI, Johnstone SE, Young RA: **Chromatin immunoprecipitation and microarray-based analysis of protein location.** *Nat Protoc* 2006, **1**(2): 729–748.
70. Salmon-Divon M, Dvinge H, Tammoja K, Bertone P: **PeakAnalyzer: genome-wide annotation of chromatin binding and modification loci.** *BMC Bioinforma* 2010, **11**:415.
71. Flicek P, Amodio MR, Barrell D, Beal K, Brent S, Chen Y, Clapham P, Coates G, Fairley S, Fitzgerald S, *et al*: **Ensembl 2011.** *Nucleic Acids Res* 2011, **39**(Database issue):D800–806.
72. Fujita PA, Rhead B, Zweig AS, Hinrichs AS, Karolchik D, Cline MS, Goldman M, Barber GP, Clawson H, Coelho A, *et al*: **The UCSC Genome Browser database: update 2011.** *Nucleic Acids Res* 2011, **39**(Database issue): D876–882.
73. Machanick P, Bailey TL: **MEME-ChIP: motif analysis of large DNA datasets.** *Bioinformatics* 2011, **27**(12):1696–1697.
74. Gupta S, Stamatoyannopoulos JA, Bailey TL, Noble WS: **Quantifying similarity between motifs.** *Genome Biol* 2007, **8**(2):R24.
75. Perona R, Montaner S, Saniger L, Sanchez-Perez I, Bravo R, Lacal JC: **Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins.** *Genes Dev* 1997, **11**(4):463–475.
76. Al-Shahrour F, Minguet P, Tarraga J, Medina I, Alloza E, Montaner D, Dopazo J: **FatiGO +: a functional profiling tool for genomic data. Integration of functional annotation, regulatory motifs and interaction data with microarray experiments.** *Nucleic Acids Res* 2007, **35**(Web Server issue): W91–96.
77. Medina I, Carbonell J, Pulido L, Madeira SC, Goetz S, Conesa A, Tarraga J, Pascual-Montano A, Nogales-Cadenas R, Santoyo J, *et al*: **Babelomics: an integrative platform for the analysis of transcriptomics, proteomics and genomic data with advanced functional profiling.** *Nucleic Acids Res* 2010, **38**(Web Server issue):W210–213.

doi:10.1186/1471-2164-13-147

Cite this article as: Ruiz-Llorente *et al*: Genome-wide analysis of Pax8 binding provides new insights into thyroid functions. *BMC Genomics* 2012 **13**:147.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- **Convenient online submission**
- **Thorough peer review**
- **No space constraints or color figure charges**
- **Immediate publication on acceptance**
- **Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar**
- **Research which is freely available for redistribution**

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

